

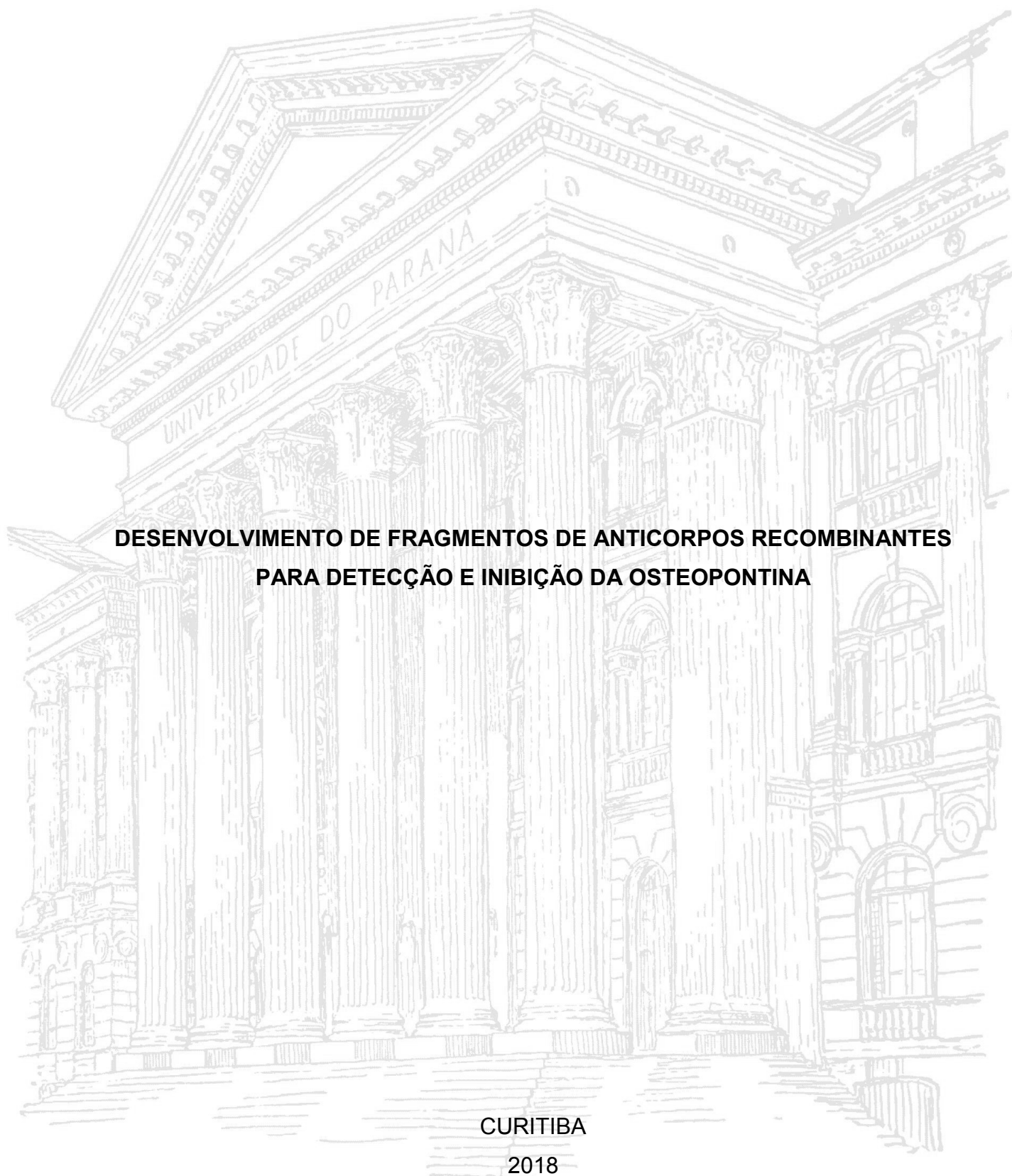
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELISA FRANQUETTO ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES
PARA DETECÇÃO E INIBIÇÃO DA OSTEOPONTINA**

CURITIBA

2018



ELISA FRANQUETTO ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES
PARA DETECÇÃO E INIBIÇÃO DA OSTEOPONTINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin
Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Gonçalves
Carneiro

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Andrade, Elisa Franquetto

Desenvolvimento de fragmentos de anticorpos recombinantes para detecção e inibição da osteopontina. / Elisa Franquetto Andrade. – Curitiba, 2018.

115 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin

Co-orientadora: Flávia Raquel Gonçalves Carneiro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Osteopontina. 2. Biomarcadores. 3. Antígenos. I. Título II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. III. Carneiro, Flávia Raquel Gonçalves. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.0792



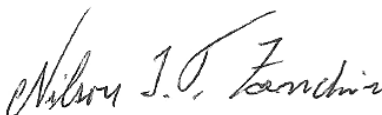
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ELISA FRANQUETTO ANDRADE** intitulada: **Desenvolvimento de Fragmentos de Anticorpos Recombinantes para Detecção e Inibição da Osteopontina**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

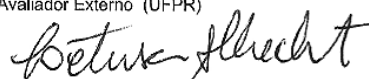
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Março de 2018.


NILSON IVO TONIN ZANCHIN

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


JULIANA FERREIRA DE MOURA
Avaliador Externo (UFPR)


LETUSA ALBRECHT
Avaliador Externo (ICC)

Dedico esse trabalho ao meu pai,
Enio, e à minha mãe, Mariane,
por todo o amor e cuidado que
vocês sempre tiveram e
demonstraram para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por toda ajuda e cuidado durante essa caminhada, e por não me deixar desanimar;

Aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio e incentivo que me deram;

Ao meu namorado, por sempre me ouvir e estar pronto a ajudar;

À minha família e aos meus amigos, por estarem presentes;

Aos meus colegas do laboratório, por toda a ajuda fornecida para que esse trabalho pudesse ser realizado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, por todo o aprendizado e orientação que me proporcionou;

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Flávia Raquel Gonçalves Carneiro, pela orientação e ajuda com os experimentos em culturas de células;

À Ana Carolina Schwarzer, pela ajuda com os experimentos em cultura de células;

Ao Claudemir Souza e à Erika Izumi, pela ajuda com os experimentos em levedura.

À equipe da Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – FIOCRUZ.

À equipe da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Carlos Chagas (ICC) - FIOCRUZ

Ao Andrey Nascimento, por realizar as clonagens da osteopontina nos vetores de expressão;

À Priscila Hiraiwa, por ceder o clone da EGFP subclonada em pDEST17;

À Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães, pela ajuda com os ensaios de termoforese em microescala;

À Profa. Dra. Letusa Albrecht e à Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura, pelas sugestões.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade;

À Universidade Federal do Paraná e ao Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ;

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre de Deus em tudo o que fizer e Ele lhe mostrará o caminho certo. Não fique pensando que você é sábio; tema o Senhor e não faça nada que seja errado.”

(Provérbios 3:5-7)

RESUMO

A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada secretada, para a qual são atribuídas funções na biomineralização, reabsorção óssea e no sistema imune. Seu mecanismo de ação é mediado por receptores de membrana celular, incluindo integrinas e CD44. Desregulação de osteopontina tem sido associada a processos patológicos como doenças autoimunes e progressão de tumores. Como seu nível de expressão encontra-se aumentado em uma variedade de cânceres, a osteopontina pode servir como um biomarcador nestas condições, podendo ser também um alvo para terapia. Dentre as ferramentas bioquímicas que podem ser usadas tanto para detecção como para inibir a ação da osteopontina estão os anticorpos. Para aplicações biotecnológicas e biomédicas podem ser usados fragmentos de anticorpos contendo apenas a parte de ligação ao antígeno, como é o caso da fração de ligação ao antígeno (Fab) e dos fragmentos de cadeia única da fração variável (scFv). O presente trabalho tem como objetivo a produção de três fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv (denominados 14-8, 14-9 e 14-10) e de dois fragmentos do tipo Fab (14-8 e 14-10) para detecção e inibição da osteopontina. Genes sintéticos que codificam scFv e Fab otimizados para expressão em *Escherichia coli* e em *Pichia pastoris*, respectivamente, foram adquiridos pela empresa GenScript. Foram realizados testes de expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab em *Pichia pastoris*. O fragmento do tipo Fab 14-10 foi obtido em baixos níveis, enquanto que para o Fab 14-8 não houve expressão. Foram realizados testes de expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em *Escherichia coli* com subsequente purificação parcial. A osteopontina em fusão com EGFP, e em fusão com GST também foram expressas em *E. coli*. Todas as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade. O rendimento dos scFvs foi relativamente baixo (0,5 mg/L de cultura) mas suficiente para sua caracterização subsequente. Os anticorpos do tipo scFv foram testados em ensaios de *Western blot* e de termoforese em microescala para determinação se estes apresentam a capacidade de reconhecer a osteopontina. Através dos ensaios de *Western blot* foi possível observar que apenas o scFv 14-8 conseguiu detectar a osteopontina, enquanto que no ensaio de termoforese em microescala, a qual é uma técnica mais sensível, todos os fragmentos do tipo scFv conseguiram detectar a osteopontina. Foi estimada a constante de dissociação para os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10, sendo estas de 75,8 nM e 364,7 nM, respectivamente. Com base nos valores de kd resultantes obtidos, podemos concluir que os fragmentos de anticorpos do tipo scFv apresentam as especificações necessárias para testar o seu uso na detecção e inibição da osteopontina.

Palavras-chave: Osteopontina. scFv. Fab. Expressão de proteínas recombinantes. *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

Osteopontin is a secreted phosphorylated glycoprotein, which acts in biomineralization, bone resorption and in the immune system. Its mechanism of action is mediated by cell membrane receptors, including integrins and CD44. Osteopontin dysfunction has been associated with pathological processes such as autoimmune diseases and tumor progression. The expression level of osteopontin is increased in a variety of cancers, indicating that it can serve as a biomarker of cancer and possibly also be a target for therapy. Among the biochemical tools that can be used for detection and inhibition of osteopontin are the antibodies. Modified antibodies with only the functional site of antigen binding, such as antigen-binding fragments (Fab) and single chain fragment variable (scFv) can be used for biomedical and biotechnological applications. The objective of this work is the production of three scFv fragments (14-8, 14-9 e 14-10) and two Fab fragments (14-8 and 14-10) for the detection and inhibition of osteopontin. Fab and scFv synthetic genes optimized for *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* expression, respectively, were acquired from GenScript. Expression of Fab fragments was performed in *Pichia pastoris*. However, only one of the Fab (14-10) was obtained at low levels, while the other was not expressed. The scFv fragments were expressed in *E. coli* and partially purified by affinity chromatography. Osteopontin in fusion with EGFP and with GST were also expressed in *E. coli*. All recombinant proteins were purified using affinity chromatography. The yield of the scFv fragments was relatively low (~0,5 mg/L of culture) but sufficient for subsequent characterization. Interaction of osteopontin with antibody fragments was tested by Western blot and by microscale thermophoresis. Only one scFv antibody (14-8) was shown to detect osteopontin by Western blot. However, using microscale thermophoresis, which is a far more sensitive method, osteopontin was detected by all three scFv antibodies. The estimated dissociation constant for the scFv 14-8 and scFv 14-10 antibody fragments was 75,8 nM and 364,7 nM, respectively. These kd values are in the acceptable range to test their potential to detect and inhibit osteopontin.

Key-words: Osteopontin. scFv. Fab. Expression of recombinant proteins. *Pichia pastoris*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ISOFORMAS DA OSTEOPONTINA.....	19
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA OSTEOPONTINA	19
FIGURA 3 - ASSOCIAÇÃO DA OSTEOPONTINA COM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE.....	21
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INFLUENCIADAS POR OSTEOPONTINA	22
FIGURA 5 - ESTRUTURA DE UM ANTICORPO DE CLASSE IgG E DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO Fab e scFv	24
FIGURA 6 - SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS CINCO ISOFORMAS DA OSTEOPONTINA COM EPÍTOPOS RECONHECIDOS PELOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS.....	26
FIGURA 7 - ESQUEMA DO ENSAIO DE ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS ATRAVÉS DE <i>WESTERN BLOT</i>	43
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DO ENSAIO DE TERMOFORESE EM MICROESCALA	44
FIGURA 9 - ESTRUTURA DOS CLONES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv	48
FIGURA 10 – ANÁLISE DO PLASMÍDEO pET22b CONTENDO OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv POR DIGESTÃO COM ENZIMAS NcoI e XhoI ..	49
FIGURA 11 – ANÁLISE DO PLASMÍDEO pET28b CONTENDO OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv POR DIGESTÃO COM ENZIMAS NcoI e XhoI ..	49
FIGURA 12 - ESTRUTURA DOS CLONES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab	50
FIGURA 13 - ANÁLISE DO PLASMÍDEO pPIC9K CONTENDO AS CADEIAS PESADAS DO Fab 14-8 E DO Fab 14-10 POR DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO SacI E KpnI.....	51
FIGURA 14 - ANÁLISE DO PLASMÍDEO pPICZαA CONTENDO AS CADEIAS LEVES DO Fab 14-8 E DO Fab 14-10 POR DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO HincII	52
FIGURA 15 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO Fab 14-8 E 14-10 EM <i>P. pastoris</i>	53

FIGURA 16 - TESTE DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS CONTENDO O FRAGMENTO Fab 14-8 CULTIVADAS EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZEOCINA E GENETICINA	54
FIGURA 17 - TESTE DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS CONTENDO O FRAGMENTO Fab 14-10 CULTIVADAS EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZEOCINA E GENETICINA	54
FIGURA 18 - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DOS VETORES CONTENDO OS GENES QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab 14-8 EM GENOMA DE <i>P. pastoris</i>	56
FIGURA 19 - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DOS VETORES CONTENDO OS GENES QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab 14-10 EM GENOMA DE <i>P. pastoris</i>	56
FIGURA 20 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO Fab EM <i>P. pastoris</i>	57
FIGURA 21 - EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO Fab 14-10 EM DIFERENTES TEMPOS E CONDIÇÕES DE pH.....	59
FIGURA 22 - TESTES DE INDUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv A PARTIR DE pET22b COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG.....	60
FIGURA 23 - TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv	61
FIGURA 24 - ANÁLISE COMPARATIVA DE EFICIÊNCIA DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO scFv COM OS VETORES pET22b E pET28b	62
FIGURA 25 - SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UREIA.....	63
FIGURA 26 – ENSAIOS DE DESNATURAÇÃO E RENATURAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv	64
FIGURA 27 - PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8 E 14-9 OBTIDOS A PARTIR DOS CORPOS DE INCLUSÃO SOLUBILIZADOS E RENATURADOS	64
FIGURA 28 - TESTE DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS FRAGMENTOS DO TIPO scFv 14-8, 14-9 E 14-10 SUBCLONADOS EM pET22b..	65

FIGURA 29 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv A PARTIR DE INDUÇÃO DE 1 L EM <i>E. coli</i> BL21-Star(DE3)	66
FIGURA 30 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8, 14-9 e 14-10 A PARTIR DE INDUÇÃO DE 1 L EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ slyD pRARE.....	68
FIGURA 31 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8 e 14-10 A PARTIR DE INDUÇÃO DE 1 L EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ slyD pRARE	69
FIGURA 32– PURIFICAÇÃO PARCIAL DO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv anti-HBsAg	70
FIGURA 33 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO GST-OPN	71
FIGURA 34 - PURIFICAÇÃO DA GST	71
FIGURA 35 – PURIFICAÇÃO DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À EGFP	73
FIGURA 36 - PURIFICAÇÃO DE EGFP	74
FIGURA 37 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA slyD	75
FIGURA 38 - ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA VERIFICAR ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv	76
FIGURA 39 - ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA VERIFICAR ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv PARCIALMENTE PURIFICADOS A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO SOLUBILIZADOS.....	77
FIGURA 40 - ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA VERIFICAR ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv PARCIALMENTE PURIFICADOS DOS EXTRATOS SOLÚVEIS	78
FIGURA 41 - ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO DEMONSTRANDO AS DUAS POPULAÇÕES DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 10 e 100 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE	92
FIGURA 42 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 1 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 10 e 100 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE	94
FIGURA 43 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 2 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 10 e 100 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE	95

FIGURA 44 - ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO DEMONSTRANDO AS DUAS POPULAÇÕES DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE	96
FIGURA 45 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 1 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE	97
FIGURA 46 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 2 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE	97
FIGURA 47 - TESTE DE ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS EGFP-OPN E EGFP INCUBADAS EM MEIO DE CULTURA COM AS CÉLULAS THP-1 EM DIFERENTES TEMPOS	99
FIGURA 48 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pGEX-4T1 USADO PARA A CLONAGEM DA OSTEOPONTINA	111
FIGURA 49 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET28a	112
FIGURA 50 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET22b USADO PARA A SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv	113
FIGURA 51 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET28b USADO PARA A SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv	114
FIGURA 52 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pPIC9K USADO PARA A SUBCLONAGEM DAS CADEIAS PESADAS DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO Fab.....	114
FIGURA 53 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pPICZαA USADO PARA A SUBCLONAGEM DAS CADEIAS LEVES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO Fab	115

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv 14-8	80
GRÁFICO 2 – INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv 14-9	80
GRÁFICO 3 – INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv 14-10	81
GRÁFICO 4 – EXPERIMENTO CONTROLE COM EGFP-OPN E OVALBUMINA ...	81
GRÁFICO 5 – VERIFICAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv-14-8 E EXPERIMENTO CONTROLE EGFP E scFv 14-8.....	84
GRÁFICO 6 – VERIFICAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv-14-10 E EXPERIMENTO CONTROLE EGFP E scFv 14-10.....	85
GRÁFICO 7 – EXPERIMENTO CONTROLE ENTRE FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv anti-HBsAg E EGFP-OPN.....	86
GRÁFICO 8 – CURVAS DE AFINIDADE DE INTERAÇÃO ENTRE FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-8 E EGFP-OPN.....	87
GRÁFICO 9 – CURVA DE AFINIDADE DE INTERAÇÃO ENTRE FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-10 E EGFP-OPN.....	88
GRÁFICO 10 – EXPERIMENTO CONTROLE EM RELAÇÃO À FLUORESCÊNCIA NORMALIZADA RESULTANTE DE EGFP-OPN EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE scFv anti-HBsAg.....	89
GRÁFICO 11 – CURVA DE CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO EM RELAÇÃO AO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-8 E EGFP-OPN.....	90
GRÁFICO 12 – CURVA DE CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO EM RELAÇÃO AO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-10 E EGFP-OPN.....	91
GRÁFICO 13 – INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELA POPULAÇÃO TOTAL DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - OBTENÇÃO DOS GENES SINTÉTICOS QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv E Fab, PROTEÍNA L FUSIONADA À EGFP e slyD	29
TABELA 2 - CEPAS DE <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> UTILIZADAS	30
TABELA 3 – PLASMÍDEOS PARA <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> UTILIZADOS	30
TABELA 4 – PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS CADEIAS PESADAS E LEVES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OSTEOPONTINA: EXPRESSÃO, ISOFORMAS E ESTRUTURA	18
1.2	FUNÇÕES DA OSTEOPONTINA.....	20
1.2.1	Adesão de osteoclastos e osteoblastos.....	20
1.2.2	Regulação da biomineralização.....	20
1.2.3	Associação da osteopontina com sistema imune	20
1.3	FUNÇÕES DA OSTEOPONTINA EM SITUAÇÕES PATOLÓGICAS	21
1.3.1	Associação da osteopontina com inflamação e doenças autoimunes	21
1.3.2	Associação da osteopontina com câncer	22
1.4	OSTEOPONTINA COMO ALVO TERAPÊUTICO	23
1.5	FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES COMO INIBIDORES COMPETITIVOS	24
1.6	FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv E Fab CONTRA A OSTEOPONTINA	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	OBTENÇÃO DOS GENES, CEPAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO	29
3.2	CLONAGEM DA OSTEOPONTINA.....	31
3.2.1	Clonagem da osteopontina no vetor pGEX-4T1	31
3.2.2	Clonagem da osteopontina no vetor pET28a	31
3.2.3	Clonagem da osteopontina fusionada à EGFP no vetor pET28a	31
3.3	TRANSFORMAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS EM <i>E. coli</i> ..	32
3.4	DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDAL.....	33
3.5	LIGAÇÃO DOS INSERTOS AOS VETORES DE EXPRESSÃO	33
3.6	ANÁLISE DO DNA PLASMIDAL POR DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	34
3.7	TRANSFORMAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab EM <i>P. pastoris</i>	34
3.8	SELEÇÃO DE MÚLTIPLAS CÓPIAS	34

3.9	ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO DO CASSETTE DE EXPRESSÃO DOS VETORES DE <i>P. pastoris</i> POR PCR	35
3.10	EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO Fab EM <i>P. pastoris</i> GS115	36
3.11	EXPRESSÃO EM <i>E. coli</i>	37
3.11.1	Expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3) e <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ slyD pRARE	37
3.11.2	Expressão da osteopontina e de GST em <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3)	37
3.11.3	Expressão de EGFP em <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3)	37
3.11.4	Expressão de slyD em <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3)	38
3.12	PREPARO DOS EXTRATOS CELULARES	38
3.12.1	Lise das células por sonicação	38
3.12.2	Lise das células por microfluidificador	39
3.13	ENSAIOS DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO	39
3.14	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	40
3.14.1	Purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado	40
3.14.1.1	Testes de purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv e slyD através de sedimentação por centrifugação	40
3.14.1.2	Testes de purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv através de coluna	40
3.14.2	Purificação de GST-OPN e GST por cromatografia de afinidade com glutathione-Sepharose	41
3.14.3	Purificação de EGFP-OPN e EGFP utilizando o sistema semi-automatizado ÄKTA	41
3.15	ENSAIOS DE ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS ATRAVÉS DE WESTERN BLOT	42
3.16	ENSAIO DE INTERAÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS E DA OSTEOPONTINA ATRAVÉS DE TERMOFORESE EM MICROESCALA	43
3.17	TESTES DE LIGAÇÃO DA OSTEOPONTINA AOS SEUS RECEPTORES CELULARES	45
3.17.1	Cultivo celular	46
3.17.2	Teste de estabilidade das proteínas	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	VETORES DE EXPRESSÃO CONSTRUÍDOS	48

4.1.1	Confirmação dos plasmídeos contendo os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv por digestão com enzimas de restrição	48
4.1.2	Confirmação dos plasmídeos contendo os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo Fab por digestão com enzimas de restrição.....	50
4.2	SELEÇÃO DE MÚLTIPLAS CÓPIAS DOS TRANSFORMANTES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab EM <i>Pichia pastoris</i>	52
4.3	ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DOS VETORES DE <i>P. pastoris</i> POR PCR	55
4.4	TESTES DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO Fab EM <i>P. pastoris</i> GS115	57
4.5	OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE DO TIPO Fab EM <i>P. pastoris</i> GS115	58
4.6	TESTES DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8, 14-9 E 14-10.....	60
4.6.1	Testes de expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em <i>E. coli</i> BL21-Star(DE3) com diferentes concentrações de IPTG.....	60
4.6.2	Comparação da expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados em pET22b e pET28b em <i>E. coli</i> BL21-Star(DE3)	61
4.6.3	Purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv dos extratos solúveis e ressolubilizados a partir de corpos de inclusão	62
4.6.4	Expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em escala de 1 L de cultura em <i>E. coli</i> BL21-Star(DE3)	66
4.6.5	Expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em escala de 1 L de cultura em <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ slyD pRARE	67
4.7	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv ANTI-HBsAg	69
4.8	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À GST E DE GST EM <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3)	70
4.9	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À EGFP EM <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3).....	72
4.10	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE EGFP EM <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3)....	73
4.11	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE slyD EM <i>E. coli</i> BL21-STAR(DE3)	74
4.12	ENSAIOS DE ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv ATRAVÉS DE WESTERN BLOT	75

4.13	ENSAIO DE INTERAÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv E DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À EGFP ATRAVÉS DE TERMOFORESE EM MICROESCALA	79
4.13.1	Análise da interação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 com a osteopontina	79
4.13.2	Análise da constante de dissociação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 com a osteopontina fusionada à EGFP	82
4.14	TESTES DE LIGAÇÃO DA OSTEOPONTINA AOS SEUS RECEPTORES CELULARES	91
4.15	TESTE DE ESTABILIDADE DE EGFP-OPN E EGFP EM MEIO DE CULTURA COM AS CÉLULAS THP-1	98
5	CONCLUSÕES	100
6	PERSPECTIVAS	102
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO A – SEQUÊNCIAS DOS GENES SINTÉTICOS QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv E Fab CONTRA OSTEOPONTINA.....	107
	ANEXO B – MAPA DOS VETORES DE EXPRESSÃO UTILIZADOS PARA CLONAGEM	111

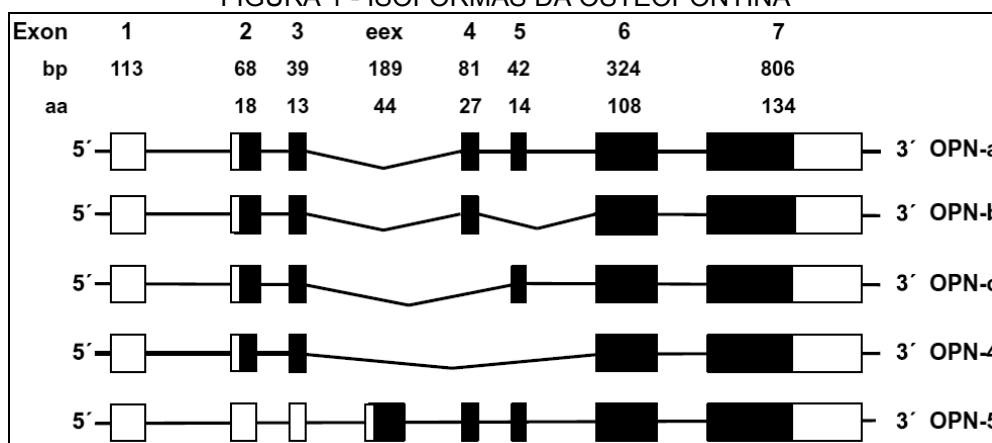
1 INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOPONTINA: EXPRESSÃO, ISOFORMAS E ESTRUTURA

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada secretada, sendo por isso também denominada de fosfoproteína secretada 1 (*Secreted Phosphoprotein 1*, SPP1). Ela é altamente expressa em tecidos mineralizados, como os ossos e os dentes, mas também pode ser encontrada no rim, atuando na deposição do cálcio urinário, e na maioria das secreções corporais, como a saliva, urina, leite materno e bile (GIACHELLI; STEITZ, 2000; SODEK; BATISTA DA SILVA; ZOHAR, 2006). Posteriormente ela também foi descoberta como intracelular, sendo encontrada no citoplasma e no núcleo, gerada a partir de um sítio de tradução alternativo (JUNAID et al., 2007; SHINOHARA et al., 2008).

São conhecidas cinco isoformas da osteopontina geradas por *splicing* alternativo: OPN-a, OPN-b, OPN-c, OPN-4 e OPN-5. OPN-a é a isoforma canônica, formada por sete *exons* (FIGURA 1). OPN-b não contém o *exon* 5 e devido a isso apresenta menos domínios fosforilados. OPN-c não contém o *exon* 4. Este *exon* apresenta uma sequência de reconhecimento de transglutaminase, a qual pode ajudar na formação de complexos poliméricos através de *crosslink*, podendo potencializar a resposta celular da osteopontina, como por exemplo, através da polimerização das isoformas OPN-a e OPN-b. OPN-4, assim como OPN-c não contém o *exon* 4, e além deste, também não contém o *exon* 5. OPN-5 contém um *exon* extra, o qual apresenta um sítio de tradução alternativo, resultando na isoforma mais longa da osteopontina (BRIONES-ORTA et al., 2017).

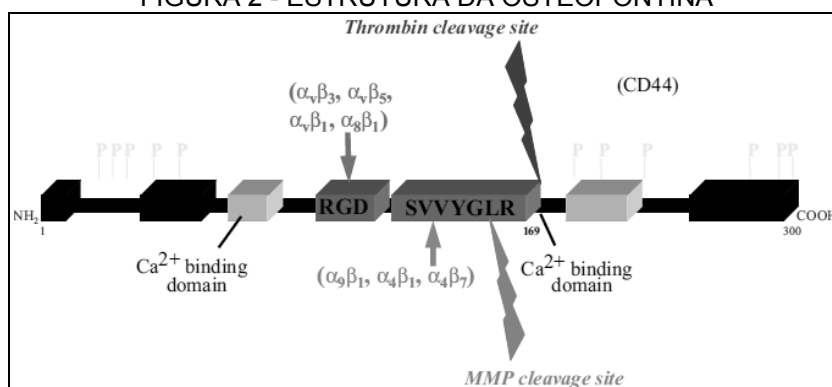
FIGURA 1 - ISOFORMAS DA OSTEOPONTINA



FONTE: Briones-Orta et al. (2017). OPN-a é a isoforma canônica da osteopontina, formada por sete *exons*. O *splicing* alternativo dos *exons* 4 e 5 geram as isoformas OPN-b, OPN-c e OPN-4. OPN-5 contém um *exon* extra (eex), localizado entre os *exons* 3 e 4. Em branco: região não traduzida (UTR, *untranslated region*). Em preto: regiões codificantes.

A osteopontina é uma proteína intrinsecamente desestruturada, não apresentando estruturas secundária e terciária definidas (PLATZER et al., 2011). Ela apresenta domínios de ligação a integrinas e a variantes de CD44 em sua estrutura. As integrinas e os variantes de CD44 são moléculas receptoras presentes na membrana celular, que podem se ligar a proteínas da matriz extracelular, como a osteopontina, e mediar a adesão de células à estas proteínas. A ligação da osteopontina a integrinas ocorre através de seu domínio arginina-glicina-aspartato (RGD) ou através do domínio SVVYGLR, presente na osteopontina de origem humana, ou do domínio SLAYGLR, presente na osteopontina de camundongos (FIGURA 2). A osteopontina apresenta também dois domínios de ligação ao cálcio e dois domínios de ligação a heparina (LUND; GIACHELLI; SCATENA, 2009).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DA OSTEOPONTINA



FONTE: Lund, Giachelli e Scatena (2009). Estrutura da osteopontina, demonstrando os domínios de ligação à integrinas (domínio RGD e domínio SVVYGLR) e os receptores dos domínios de ligação ao cálcio em amarelo e outros domínios de ligação à matriz em preto, sítios de fosforilação e sítios de clivagem proteolítica com as respectivas proteases indicadas.

A osteopontina pertence à família de proteínas SIBLING (*small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*), a qual, além da osteopontina, é composta pela fosfoglicoproteína de matriz extracelular (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*, MEPE), proteína ácida 1 da matriz da dentina (*dentin matrix protein 1*, DMP1), sialofosfoproteína da dentina (*dentin sialophosphoprotein*, DSPP) e sialoproteína óssea (*bone sialoprotein*, BSP). Todas as proteínas dessa família são fosforiladas e secretadas, apresentam o domínio de ligação a integrinas (RGD) e têm importante papel na biomineralização (FISHER et al., 2001).

1.2 FUNÇÕES DA OSTEOPONTINA

1.2.1 Adesão de osteoclastos e osteoblastos

A adesão de osteoblastos e de osteoclastos à matriz óssea são mediadas pela osteopontina. Enquanto os osteoblastos atuam na reabsorção óssea, através da acidificação no local de ancoramento e de secreção de proteases que degradam o colágeno e outras proteínas da matriz óssea, os osteoblastos atuam na formação óssea, através do armazenamento de cálcio (GIACHELLI; STEITZ, 2000).

1.2.2 Regulação da biomineralização

A osteopontina atua também como reguladora da biomineralização no tecido ósseo. Através da ligação à hidroxiapatita (mineral composto de fosfato de cálcio) e íons de cálcio, ela consegue reduzir o crescimento e agregação de cristais de cálcio nos tecidos epiteliais, evitando assim, a calcificação ectópica (STEITZ et al., 2002).

1.2.3 Associação da osteopontina com sistema imune

A osteopontina é também denominada de fator de ativação-1 precoce de linfócitos T (*early T-lymphocyte activation 1*, Eta-1), devido a ser altamente expressa em células T ativadas. Ela desempenha funções na adesão, migração e co-estimulação da proliferação de células T (LUND; GIACHELLI; SCATENA, 2009).

No sistema imune a osteopontina tem uma grande associação na resposta a estímulos de inflamação, atuando na migração de macrófagos e células dendríticas

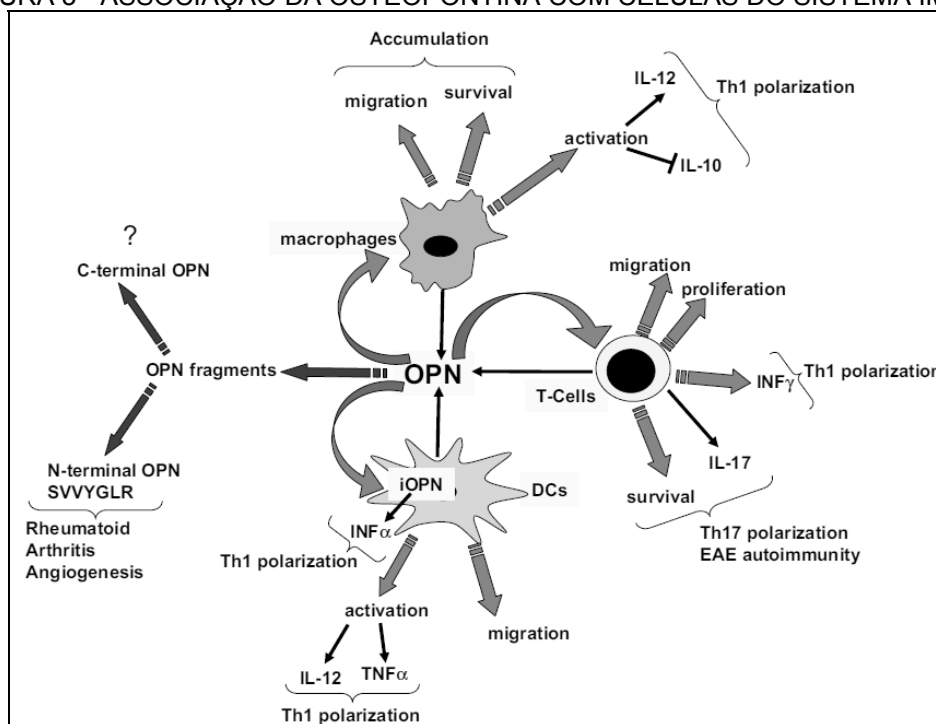
para locais de inflamação, e auxiliando na cicatrização de feridas (FRENZEL; WEISS, 2011; LUND; GIACHELLI; SCATENA, 2009).

1.3 FUNÇÕES DA OSTEOPONTINA EM SITUAÇÕES PATOLÓGICAS

1.3.1 Associação da osteopontina com inflamação e doenças autoimunes

O domínio *SVVYGLR* ou *SLAYGLR* presente na osteopontina está também associado à propagação da doença autoimune artrite reumatóide (FIGURA 3) (LUND; GIACHELLI; SCATENA, 2009; YAMAMOTO et al., 2003). A osteopontina também foi associada à encefalomielite autoimune experimental, um modelo murino de esclerose múltipla, através da indução de IL-17 (LUND; GIACHELLI; SCATENA, 2009; MURUGAIYAN; MITTAL; WEINER, 2008). Além desses fatores, a osteopontina consegue estimular a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α , e inibir a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. (ASHKAR et al., 2000; LUND; GIACHELLI; SCATENA, 2009).

FIGURA 3 - ASSOCIAÇÃO DA OSTEOPONTINA COM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE



FONTE: Lund, Giachelli e Scatena (2009). Associação da osteopontina com células do sistema imune. A osteopontina modula a função de células T, macrófagos e células dendríticas (DCs). OPN estimula a produção de IL-12 e TNF α e inibe a produção de IL-10, induzindo a polarização de Th1. O domínio N-terminal *SVVYGLR* da osteopontina está associado à propagação de artrite reumatóide e angiogênese.

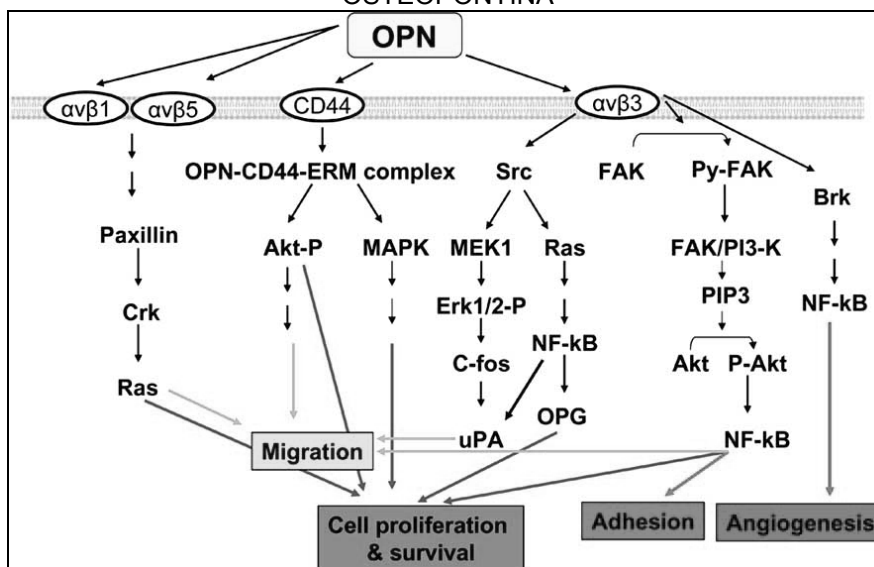
Foram também encontrados altos níveis de expressão de osteopontina no plasma de pacientes com as doenças autoimunes esclerose múltipla e neuromielite óptica em comparação ao plasma de pacientes saudáveis (SHIMIZU et al., 2013).

Os altos níveis de expressão da osteopontina em pacientes com as doenças autoimunes de artrite reumatóide, esclerose múltipla e neuromielite óptica demonstram a relevância desta proteína como um potencial alvo terapêutico para estas doenças.

1.3.2 Associação da osteopontina com câncer

A interação da osteopontina com os receptores celulares integrinas $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ e CD44 desencadeia vias de transdução de sinal mediadas por proteínas tirosinas quinases FAK, Src e Brk, proteínas do citoesqueleto e paxilina, que resultam na alteração de comportamentos celulares, como adesão, proliferação, sobrevivência, migração e angiogênese (FIGURA 4) (SHEVDE et al., 2010).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INFLUENCIADAS POR OSTEOPONTINA



FONTE: Shevde et al. (2010). Vias de sinalização influenciadas pela osteopontina, demonstrando os receptores celulares, as proteínas efetoras e os comportamentos celulares resultantes.

Ao ser capaz de estimular fatores relacionados com a invasão tumoral, como metaloproteinases que fazem a degradação da matriz extracelular, essa proteína está relacionada à progressão de tumores e metástases. No trabalho de Yang e colaboradores (2014), em estudo em carcinoma hepatocelular, foi demonstrado que

através da ligação com o receptor CD44, a osteopontina consegue mediar a redução da expressão de IRF1 (*interferon regulatory factor-1*), o qual é um supressor tumoral que reduz a transcrição de HOTAIR. HOTAIR é um RNA longo não codificante, que consegue promover metástase de células cancerígenas através da reprogramação do estado da cromatina, o que resulta no silenciamento da transcrição de genes supressores de metástase (GUPTA et al., 2010). Com a redução da expressão de IRF1 pela osteopontina, ocorre o aumento do nível de expressão de HOTAIR, o qual promove a metástase. Esse estudo indica a relevância da osteopontina como um potencial alvo para terapia do câncer.

A osteopontina apresenta também nível de expressão significativamente aumentado em sangue de pacientes com câncer de pulmão (JIN et al., 2012), ovário (SONG et al., 2008), próstata (TILLI et al., 2012) e mama (THORAT et al., 2013), sendo assim um marcador muito interessante de se avaliar nestas situações.

Níveis aumentados de osteopontina também foram detectados *in vitro* (HESLING et al., 2007) em um modelo de deficiência da proteína SBDS (*Shwachman-Bodian-Diamond syndrome*) associada à síndrome de mesmo nome, a qual é caracterizada por insuficiência pancreática, disfunção da medula óssea e predisposição ao desenvolvimento de leucemia (SMITH, 2002).

As diferentes funções da osteopontina são desencadeadas e reguladas por modificações pós-traducionais, como fosforilação, glicosilação e clivagem proteolítica. A fosforilação, por exemplo, auxilia na ligação à integrinas e na indução e secreção de citocinas (CHRISTENSEN et al., 2010; INOUE; SHINOHARA, 2011). A osteopontina também é um substrato para trombina e metaloproteinases, as quais quando clivam seus sítios de clivagem, propicia a exposição do domínio *SVVYGLR* ou *SLAYGLR*, facilitando também a interação com as integrinas $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha 4\beta 7$ (LUND; GIACHELLI; SCATENA, 2009).

1.4 OSTEOPONTINA COMO ALVO TERAPÊUTICO

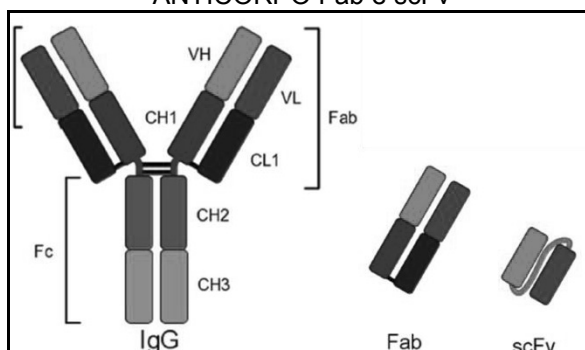
Devido às situações patológicas nas quais a osteopontina está envolvida, ela emergiu como um potencial alvo de terapia para o câncer e doenças autoimunes, e por isso, há a necessidade de formas tanto para detectar precisamente como para inibir a ação dessa proteína.

Como a osteopontina também é uma proteína extracelular, o acesso a ela por moléculas que possam inibir sua função é mais fácil do que se fosse apenas intracelular. Devido a isso, destaca-se o uso de anticorpos, os quais podem ser usados para determinação dos níveis séricos de osteopontina e também como competidores dos seus receptores celulares e, portanto, inibir a ação induzida por ela.

1.5 FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES COMO INIBIDORES COMPETITIVOS

Como demonstrado na FIGURA 5, o protótipo de anticorpo de classe IgG é uma molécula tetramérica, constituída de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, sendo estas conectadas por ligações dissulfeto. Em termos funcionais, o reconhecimento do antígeno é realizado pelas cadeias pesadas e leves da região variável (VH e VL na FIGURA 5), com as regiões constantes CH1/CL1, CH2 e CH3 desempenhando funções efetoras. Para aplicações biotecnológicas e biomédicas podem ser usados fragmentos de anticorpos contendo apenas a parte funcional das regiões variáveis. Assim fragmentos de anticorpos recombinantes podem ser gerados de várias formas, sendo os mais comuns os fragmentos de cadeia única da fração variável (scFv, *single chain fragment variable*) e o fragmento de ligação ao antígeno (Fab, *antigen-binding fragments*), composto pela região variável e pelas regiões CH1/CL1.

FIGURA 5 - ESTRUTURA DE UM ANTICORPO DE CLASSE IgG E DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO Fab e scFv



FONTE: Adaptado de Frenzel, Hust e Schirrmann (2013). Estrutura demonstrando o anticorpo de classe IgG, constituído de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves de regiões variáveis e constantes, fragmento de ligação ao antígeno (Fab), composto pela cadeia pesada (VH) e leve (VL) da região variável e pela cadeia pesada (CH1) e leve (CL1) da região constante, e fragmento de cadeia única da fração variável (scFv), composto pela cadeia pesada (VH) e leve (VL) da região variável unidas através de um *linker*.

Os fragmentos de anticorpos apresentam imunogenicidade reduzida em relação ao anticorpo completo, e como também normalmente não apresentam modificações pós traducionais, podem ser preferencialmente expressos em sistemas mais simples, como bactérias e leveduras, ao contrário do anticorpo completo, no qual há a necessidade um sistema mais complexo, como o de células de mamíferos (GUPTA; SHUKLA, 2016).

Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv têm a vantagem de ser a menor fração de um anticorpo suficiente para ligação ao antígeno, apresentando uma complexidade menor em relação ao anticorpo completo e ao Fab, e podem então ser mais facilmente produzidos em células procarióticas (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013).

O fragmento de ligação ao antígeno (Fab) exige a montagem de duas cadeias polipeptídicas independentes e necessita de um sistema mais complexo para co-expressão, por isso, tipicamente é produzido com rendimentos baixos em *E. coli*, e uma alternativa é sua expressão em leveduras (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* em alguns casos tem sido usada com sucesso para a produção de fragmentos de anticorpos do tipo Fab, pois pode secretar grandes quantidades de proteínas, crescer em meio definido barato, ter um tempo de processamento curto, facilidade de cultivo e de manipulação genética. Por esses motivos, pode ser considerada uma alternativa mais viável do que a expressão em células de mamíferos. Devido a produção de uma elevada quantidade de proteína neste sistema, este também pode ter mais vantagens em relação ao rendimento produzido em células procarióticas (NASSER et al., 2003).

1.6 FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv e Fab CONTRA A OSTEOPONTINA

Com o objetivo de produzir fragmentos de anticorpos recombinantes que possibilitem a detecção da osteopontina, foram selecionadas sequências que codificam três anticorpos contra a osteopontina (14-8, 14-9 e 14-10) dos bancos de dados. As sequências codificadoras das regiões variáveis destes anticorpos foram sintetizadas quimicamente de forma a reconstituir anticorpos de cadeia única da fração variável (scFv) para expressão em *E. coli*, e as sequências codificadoras das

regiões variáveis e das cadeias constantes CH1 e CL1 para reconstituição da fração Fab para expressão em levedura (*P. pastoris*). Foram sintetizadas sequências nucleotídicas codificadoras para expressão de três anticorpos do tipo scFv (14-8, 14-9 e 14-10) e dois anticorpos do tipo Fab (14-8 e 14-10). O fragmento 14-8 reconhece apenas as isoformas OPN-a, OPN-b e OPN-5 da osteopontina, através da sequência de aminoácidos “*VATWLNPDPSQK*” (FIGURA 6). Já os fragmentos 14-9 (de origem murina) e 14-10 (fragmento humanizado) reconhecem uma sequência contendo o domínio de ligação de integrina RGD “*DGRGDSVYYG*”, encontrado em todas as isoformas da osteopontina (FIGURA 6). Com isso poderá ser feita a avaliação se há diferença entre as isoformas específicas e a proteína inteira quanto à sua detecção e inibição.

FIGURA 6 - SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS CINCO ISOFORMAS DA OSTEOPONTINA COM EPÍTOPOS RECONHECIDOS PELOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

OPN-a	1	-----MRIAVICFCLLGITCAIPVK----QADSGSSEEKQLYNKYPDA VATWLNPD	47
OPN-b	1	-----MRIAVICFCLLGITCAIPVK----QADSGSSEEKQLYNKYPDA VATWLNPD	47
OPN-c	1	-----MRIAVICFCLLGITCAIPVK----QADSGSSEEKQ-----	31
OPN-4	1	-----MRIAVICFCLLGITCAIPVK----QADSGSSEEKQ-----	31
OPN-5	1	MGIVPRSLDKKAHRVQFQLNRIKAKIELPWGSLQLDCLMKTLKELYNKYPDA VATWLNPD	60
OPN-a	48	PSQKQ NLLAPQNAVSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSND	107
OPN-b	48	PSQKQ NLLAPQ-----TLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSND	93
OPN-c	32	-----NAVSSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSND	80
OPN-4	32	-----TLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSND	66
OPN-5	61	PSQKQ NLLAPQNAVSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSND	120
OPN-a	108	SDDVDDTDDSHQSDSHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPTVDTY DGRGDSVYYGL	167
OPN-b	94	SDDVDDTDDSHQSDSHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPTVDTY DGRGDSVYYGL	153
OPN-c	81	SDDVDDTDDSHQSDSHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPTVDTY DGRGDSVYYGL	140
OPN-4	67	SDDVDDTDDSHQSDSHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPTVDTY DGRGDSVYYGL	126
OPN-5	121	SDDVDDTDDSHQSDSHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPTVDTY DGRGDSVYYGL	180
OPN-a	168	RSKSKKFRRPDIQYPDATDEEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYET	227
OPN-b	154	RSKSKKFRRPDIQYPDATDEEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYET	213
OPN-c	141	RSKSKKFRRPDIQYPDATDEEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYET	200
OPN-4	127	RSKSKKFRRPDIQYPDATDEEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYET	186
OPN-5	181	RSKSKKFRRPDIQYPDATDEEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYET	240
OPN-a	228	SQLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVV	287
OPN-b	214	SQLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVV	273
OPN-c	201	SQLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVV	260
OPN-4	187	SQLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVV	246
OPN-5	241	SQLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVV	300
OPN-a	288	DPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN	314
OPN-b	274	DPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN	300
OPN-c	261	DPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN	287
OPN-4	247	DPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN	273
OPN-5	301	DPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN	327

Sequências de aminoácidos das cinco isoformas da osteopontina, indicando os epítomos reconhecidos pelos fragmentos de anticorpos 14-8 (em azul, “*VATWLNPDPSQK*”) e 14-9 e 14-10 (em vermelho, “*DGRGDSVYYG*”).

Considerando que anticorpos podem competir com os receptores celulares nos quais a osteopontina se liga, e portanto, inibir as atividades patológicas pelas quais a osteopontina está associada, o presente trabalho apresenta como objetivo a expressão e análise da atividade de anticorpos recombinantes de fragmentos de cadeia única da fração variável (scFv) e da fração Fab expressos em *E. coli* e em *P. pastoris*, respectivamente. Estes fragmentos de anticorpos recombinantes poderão ser utilizados para determinar os níveis de osteopontina em amostras séricas, proporcionando a osteopontina atuar como um biomarcador para as doenças ou cânceres nos quais está envolvida, e também podem ser utilizados para testar a inibição da atividade patológica da osteopontina em estudos em cultura de células. Com o uso de dois formatos de fragmentos de anticorpos diferentes (Fab e scFv), será possível verificar qual das construções apresenta maior estabilidade e é mais eficiente para produção, e com diferentes epítomos da osteopontina reconhecidos pelos fragmentos de anticorpos, será possível verificar qual fragmento apresenta maior afinidade de ligação a esta proteína, apresentando um maior potencial de uso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse projeto foi desenvolver fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv a partir da expressão em *E. coli* e do tipo Fab a partir da expressão em *Pichia pastoris*, para detecção da osteopontina e inibição de sua atividade patológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Expressar e purificar os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv contra osteopontina em *E. coli*.
- b) Expressar e purificar os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo Fab contra osteopontina em *Pichia pastoris*.
- c) Expressar e purificar osteopontina a partir de extratos de *E. coli*.
- d) Verificar a capacidade de reconhecimento da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv e Fab.
- e) Verificar a capacidade de inibição da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv e Fab em cultura de células.
- f) Testar qual formato de fragmento de anticorpo é mais eficiente para produção e se estes formatos mantêm a mesma afinidade para a osteopontina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS GENES, CEPAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Os genes sintéticos que codificam os anticorpos scFv e Fab otimizados para expressão em *E. coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente, foram obtidos da empresa GenScript (Piscataway, NJ, USA) em pUC57. Foram adquiridos três genes sintéticos que codificam os fragmentos do tipo scFv, nos quais a cadeia leve foi ligada à cadeia pesada através de uma sequência peptídica contendo 20 aminoácidos de glicina e serina, e quatro genes sintéticos correspondentes às cadeias leves e pesadas para reconstituir dois fragmentos do tipo Fab (TABELA 1). As sequências dos genes sintéticos se encontram no ANEXO A. Os genes sintéticos que codificam a proteína L fusionada à EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), a slyD (*sensitive to lysis D*), e o anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (anti-HBsAg) também foram adquiridos da empresa GenScript. O gene sintético que codifica a proteína L fusionada à EGFP foi utilizado para a construção da osteopontina fusionada à EGFP (EGFP-OPN), o gene sintético que codifica a slyD foi utilizado como controle positivo nos ensaios de *Western blot*, e o gene sintético que codifica o anticorpo anti-HBsAg foi utilizado como controle negativo para interação nos ensaios de termoforese em microescala, devido a não apresentar detecção pela osteopontina.

TABELA 1 - OBTENÇÃO DOS GENES SINTÉTICOS QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv E Fab, PROTEÍNA L FUSIONADA À EGFP e slyD

Gene sintético	Tamanho	Referência	Empresa
scFv 14-8	797 pb	Du et al., 2008	GenScript
scFv 14-9	797 pb	Kumar et al., 2013	GenScript
scFv 14-10	797 pb	Kumar et al., 2013	GenScript
Cadeia pesada do Fab 14-8	695 pb	Du et al., 2008	GenScript
Cadeia leve do Fab 14-8	656 pb	Du et al., 2008	GenScript
Cadeia pesada do Fab 14-10	713 pb	Kumar, Tso e Tsurushita, 2012	GenScript
Cadeia leve do Fab 14-10	674 pb	Kumar, Tso e Tsurushita, 2012	GenScript
Proteína L fusionada à EGFP	1679 pb	Kremers et al., 2007	GenScript
slyD	608 pb	Scholz et al., 2005	GenScript
scFv anti-HBsAg	806 pb	Tiwari et al., 2010	GenScript

O cDNA que codifica a osteopontina foi amplificado por PCR utilizando como *template* o plasmídeo pF1K T7 Flexi - SPP1, obtido através da empresa Promega para subclonagem nos plasmídeos pGEX-4T1 e pET28a. No pGEX-4T1 está em fusão com a glutatona-S-transferase (GST) na região N-terminal. No pET28a, a osteopontina foi clonada em fusão com hexa-histidina na região C-terminal. Posteriormente, neste vetor foi inserida a EGFP no N-terminal da osteopontina. O clone da EGFP no vetor pDEST17 foi cedido pela Priscila Hiraiwa, do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ, e foi utilizado como controle negativo nos ensaios de inibição da osteopontina em cultura de células e de termoforese em microescala.

As cepas de *E. coli* e *P. pastoris* que foram utilizadas neste estudo estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 - CEPAS DE *E. coli* e *P. pastoris* UTILIZADAS

Organismo	Cepa	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i>	DH5α	<i>F- endAI hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 λ- recAI gyrA96 relAI deoR Δ(lacZYA-argF)- U169 Φ80dlacZΔM15</i>	Grant et al., 1990
<i>E. coli</i>	BL21-Star (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB - mB -) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i>	BL21(DE3) ΔslyD pRARE	<i>F- ompT hsdSB (rB - mB -) gal dcm (DE3) ΔslyD pRARE</i>	Yan et al., 2001 e Novagen
<i>P. pastoris</i>	GS115	<i>his4</i>	Life Technologies

Os plasmídeos para *E. coli* e *P. pastoris* que foram utilizados neste estudo estão descritos na TABELA 3.

TABELA 3 – PLASMÍDEOS PARA *E. coli* e *P. pastoris* UTILIZADOS

Plasmídeos	Sítios de restrição	Organismo	Referência
pET22b	Nco e XhoI	<i>E. coli</i>	Novagen
pET28b	Nco e XhoI	<i>E. coli</i>	Corey Largman (Addgene plasmid #8540)
pGEX-4T1	BamHI e NotI	<i>E. coli</i>	GE Healthcare
pET28a	NcoI e HindIII/ HindIII e XhoI	<i>E. coli</i>	Novagen
pPIC9K	EcoRI e NotI	<i>P. pastoris</i>	Invitrogen
pPICZαA	EcoRI e NotI	<i>P. pastoris</i>	Invitrogen
pRARE		<i>E. coli</i>	Novagen

3.2 CLONAGEM DA OSTEOPONTINA

3.2.1 Clonagem da osteopontina no vetor pGEX-4T1

O cDNA que codifica a osteopontina foi amplificado por PCR com a utilização do plasmídeo pF1K T7 Flexi - SPP1 como *template*, e os primers *forward* 5'-CACCGGATCCATACCAGTTAAACAGGCTGATTC-3' e *reverse* 5'-CACCGCGGCCGCTTAAACATTGACCTCAGAAGATG-3'. O produto foi inserido entre os sítios de restrição BamHI e NotI no vetor de expressão pGEX-4T1 (ANEXO B, FIGURA 48) em fusão com GST.

A osteopontina subclonada no vetor pGEX-4T1 foi utilizada nos ensaios de reconhecimento da osteopontina pelos anticorpos através de *Western blot*. O vetor pGEX-4T1 vazio, por apresentar a etiqueta de GST, também foi utilizado como controle negativo nestes ensaios.

3.2.2 Clonagem da osteopontina no vetor pET28a

O cDNA que codifica a osteopontina foi amplificado por PCR com a utilização do plasmídeo pF1K T7 Flexi - SPP1 como *template*, e os primers *forward* 5'-CACCCCATGGCTATACCAGTTAAACAGGCTGATTC-3' e *reverse* 5'-CACCAAGCTTAACATTGACCTCAGAAGATG-3'. O produto foi inserido entre os sítios de restrição NcoI e HindIII no vetor de expressão pET28a-TEV em fusão com hexa-histidina na região C-terminal.

O vetor pET28a-TEV consiste no vetor pET28a (ANEXO B, FIGURA 49) modificado, com a substituição do sítio de reconhecimento de trombina por um sítio de reconhecimento da protease TEV (*tobacco etch virus*).

3.2.3 Clonagem da osteopontina fusionada à EGFP no vetor pET28a

Para os ensaios de interação da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos através de termoforese em microescala, e a análise da inibição da ligação da osteopontina em células pelos fragmentos de anticorpos através de citometria de fluxo, é necessária uma molécula fluorescente que possibilite a quantificação da interação através da quantificação da intensidade de fluorescência. Com este

objetivo, um vetor para a expressão da osteopontina fusionada à EGFP foi desenvolvido.

Foi realizada reação de PCR utilizando *primers forward* 5'-GATCAAGCTTAGCGGCTCTGGTATGGTCTCCAAAGG-3' e *reverse* 5'-CTAGCTC GAGGGCTTTATACAGTTTCATCCATGCCCAGC-3' para amplificar EGFP de um plasmídeo que contém o gene que codifica proteína L fusionado ao gene que codifica EGFP, o qual está inserido entre os sítios de HindIII e XhoI do vetor pET28a. Após reação de PCR, o produto foi purificado através do Kit da Qiagen *Mini Elute PCR Purification Kit* e digerido com as enzimas de restrição HindIII e XhoI. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1 % para extração do gene de interesse utilizando o kit de extração da Qiagen.

Após o isolamento do gene que codifica EGFP, foi realizada a ligação deste clone ao plasmídeo pET28a-TEV contendo a osteopontina inserida, através da utilização de uma unidade da enzima T4 DNA ligase (Promega). Os materiais genéticos extraídos das colônias transformantes referentes à EGFP fusionada à osteopontina inserida no vetor pET28a-TEV foram analisados por digestão com enzimas de restrição, para confirmação da subclonagem correta no vetor de expressão. A análise da inserção do gene que codifica EGFP foi realizada através da utilização das enzimas HindIII e XhoI, e a análise da inserção do gene que codifica osteopontina foi feita através das enzimas HindIII e NcoI.

3.3 TRANSFORMAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS EM *E. coli*

Os genes sintéticos que codificam os fragmentos scFv e Fab obtidos em vetor de clonagem pUC57 foram transformados em células cálciocompetentes de *E. coli* DH5 α , baseando-se no protocolo de cloreto de cálcio de Ausubel e colaboradores (2003). As células mantidas a -80 °C foram descongeladas e a elas foram adicionados 100 ng dos plasmídeos para incubação em gelo durante 30 minutos, e posterior choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB (Luria Bertani) às amostras e elas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm durante 1 hora. Posteriormente, foram cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina (antibiótico ao qual o vetor pUC57 apresenta gene de resistência em *E. coli*).

3.4 DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDAL

O DNA plasmidal dos genes que codificam os fragmentos de anticorpos do tipo scFv e Fab foi extraído das células bacterianas por lise alcalina, através de protocolo estabelecido no laboratório. Para isolar o inserto do vetor pUC57, 5 µg de DNA de cada clone foram clivados com as enzimas de restrição respectivas, sendo utilizadas NcoI e XhoI para os fragmentos de anticorpos do tipo scFv anti-osteopontina e anti-HBsAg e EcoRI e NotI para os fragmentos do tipo Fab anti-osteopontina. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e o fragmento de interesse extraído do gel, com a utilização de kit de extração da Qiagen de acordo com as especificações do fabricante.

3.5 LIGAÇÃO DOS INSERTOS AOS VETORES DE EXPRESSÃO

A ligação dos insertos purificados com o vetor de expressão foi realizada pela adição de uma unidade da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), e a reação foi mantida a 16°C durante 16 horas.

O vetor de expressão escolhido inicialmente para os fragmentos de anticorpos do tipo scFv foi o pET22b (ANEXO B, FIGURA 50), no qual as sequências codificadoras dos fragmentos do tipo scFv são clonadas em fusão com um peptídeo sinal na região N-terminal para transporte ao periplasma. Entretanto, considerando que a expressão a partir de pET22b(+) não resultou em transporte eficiente ao periplasma e, o tratamento com choque osmótico utilizado para extrair as proteínas do periplasma causou a lise da célula, liberando todo o conteúdo intracelular, o vetor pET28b(+) (ANEXO B, FIGURA 51) foi utilizado como alternativa. Dessa forma, a construção final não possui a sequência sinal que é hidrofóbica, e portanto é possível que auxilie no rendimento da fração solúvel da proteína. Para testar se sua expressão intracelular é mais eficiente, os fragmentos de anticorpos do tipo scFv foram também ligados ao vetor pET28b(+).

Para os fragmentos do tipo Fab, que exigem a montagem de duas cadeias polipeptídicas independentes, foi utilizado o vetor de expressão pPIC9K (ANEXO B, FIGURA 52) para subclonagem das cadeias pesadas e o vetor pPICZαA (ANEXO B, FIGURA 53) para as leves.

3.6 ANÁLISE DO DNA PLASMIDAL POR DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A reação da ligação foi transformada em *E. coli* DH5 α e posteriormente realizada a extração do DNA plasmidal das colônias transformantes e a digestão destes com as enzimas de restrição usadas na clonagem para cada plasmídeo. As digestões foram analisadas em gel de agarose para verificar se os plasmídeos liberaram o inserto de tamanho esperado. Após confirmação, os plasmídeos foram novamente transformados em DH5 α para amplificação e analisados por sequenciamento para a confirmação de sua construção.

3.7 TRANSFORMAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab EM *P. pastoris*

Os vetores contendo as cadeias leve e pesada de cada Fab foram linearizados com a enzima SacI para possibilitar a posterior integração destes no genoma da levedura. A co-transformação das cadeias leve e pesada de cada anticorpo em levedura *P. pastoris* foi baseada no protocolo de cloreto de lítio do manual “*Pichia Expression Kit*” da Life Technologies (2014). Os transformantes foram cultivados em placas contendo meio seletivo MD (Minimal Dextrose Medium), 100 μ g/mL de zeocina, e sem suplementação de histidina, pois a cepa GS115 apresenta uma mutação no gene de *histidinol desidrogenase* (his4), que a impede de sintetizar histidina e, portanto, não consegue ser cultivada na ausência desta, esta deficiência é complementada com o plasmídeo pPIC9K, o qual apresenta o gene HIS4, que permite seu crescimento em meio sem histidina, sendo uma forma de selecionar este vetor. O controle negativo utilizado foi a cepa GS115, sem a inclusão do DNA do plasmídeo. As placas foram mantidas a 30 °C durante quatro dias.

Dezesseis colônias transformantes de cada Fab foram selecionadas e cultivadas novamente em placas contendo 100 μ g/mL de zeocina.

3.8 SELEÇÃO DE MÚLTIPLAS CÓPIAS

Através da utilização das colônias cultivadas em 100 μ g/mL de zeocina, foram realizados testes de crescimento em diferentes concentrações dos antibióticos

geneticina (seleção de pPIC9K) e zeocina (seleção de pPICZαA), para a seleção de múltiplas cópias. Para isso foram realizados inóculos para 18 colônias transformantes do Fab 14-8 e 15 colônias transformantes do Fab 14-10, contendo 2 mL de meio MD e 100 µg/mL de zeocina. Após os inóculos se manterem em fase estacionária, foram realizadas diluições 1:100 e 1:1000 da cultura, e aplicados 7 µL de cada diluição em placas contendo meio MD com diferentes concentrações de antibióticos: (1) 100 µg/mL zeocina e 250 µg/mL geneticina e (2) 800 µg/mL zeocina e 1000 µg/mL geneticina. As placas foram mantidas a 30 °C durante sete dias.

3.9 ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO DO CASSETTE DE EXPRESSÃO DOS VETORES DE *P. pastoris* POR PCR

Para análise da integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* dos vetores pPICZαA e pPIC9K contendo os genes sintéticos que codificam os fragmentos de anticorpos do tipo Fab, o DNA genômico das colônias que conseguiram crescer nas concentrações mais altas de antibióticos (800 µg/mL zeocina e 1000 µg/mL geneticina) foi extraído, amplificado através de PCR e submetido a eletroforese em gel de agarose 1%.

O protocolo de extração de DNA de *P. pastoris* foi realizado de acordo com o protocolo de Lööke, Kristjuhan e Kristjuhan (2011), através da utilização de solução 0,2 M acetato de lítio e 1 % SDS para a lise das células e etanol para a precipitação de DNA.

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR, com a utilização dos *primers* para AOX1 *forward* ou AOX1 *reverse*, considerando que o promotor AOX1 está presente nos vetores pPICZαA e pPIC9K, e *primers* específicos para a região interna de cada gene que codifica a cadeia pesada ou leve dos fragmentos de anticorpos recombinantes (TABELA 4). Para amplificação das sequências que codificam as cadeias pesadas do Fab 14-8 e do Fab 14-10 foram utilizados os *primers reverse* contendo as sequências internas que codificam estes anticorpos e o *primer AOX1 forward*. Para amplificação das sequências que codificam as cadeias leves do Fab 14-8 e do Fab 14-10 foram utilizados os *primers forward* contendo as sequências internas que codificam estes anticorpos e o *primer AOX1 reverse*. Os fragmentos amplificados resultantes são de diferentes tamanhos para a cadeia leve e para a cadeia pesada de cada Fab, facilitando a confirmação das duas cadeias.

TABELA 4 – PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS CADEIAS PESADAS E LEVES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab

Primers	Sequência dos primers
AOX1 forward	5'-ATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
AOX reverse	5'-CTCAGGCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
Gene que codifica cadeia pesada Fab 14-8 reverse	5'-AGTGAATCTGTCCTTAAGTGAATCGGCG-3'
Gene que codifica cadeia leve Fab 14-8 forward	5'-GAAGATAGACGGTGCCGAACGTGG-3'
Gene que codifica cadeia pesada Fab 14-10 reverse	5'-CTGTGACCATAGTACCTTGACCCCAG-3'
Gene que codifica cadeia leve Fab 14-10 forward	5'-GAGAACAGTTGCTGCACCTTCAG-3'

3.10 EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO Fab EM *P. pastoris* GS115

Os inóculos para os testes de expressão foram selecionados de colônias de cada Fab e utilizada albumina sérica humana (HSA) como controle positivo de indução e a cepa GS115 como controle negativo. Os inóculos foram feitos em meio BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) pH 6,0 e mantidos a 30 °C a 200 rpm. Os volumes utilizados foram modificados, conforme experimento a ser realizado. Quando atingiram a densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 3,0, as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em meio BMMY (*Buffered Metanol-complex Medium*) pH 6,0, ajustando o volume de modo que a DO_{600} final se tornasse 1,0. Para a indução foi adicionado 1 % de metanol no meio de cultura das células a cada 24 horas durante 120 horas, sendo esse tempo de indução também alterado conforme o experimento. Como os vetores possuem a sequência sinal para endereçamento do gene do fator- α originado de *Saccharomyces cerevisiae*, as proteínas são secretadas diretamente para o meio extracelular. Os sobrenadantes de cada dia foram coletados e concentrados através da precipitação por ácido tricloroacético (TCA) 10 % para análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot*.

3.11 EXPRESSÃO EM *E. coli*

3.11.1 Expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em *E. coli* BL21-STAR(DE3) e *E. coli* BL21(DE3) Δ slyD pRARE

Para expressão em *E. coli*, os vetores pET22b e pET28b contendo as sequências codificadoras dos fragmentos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 foram transformados na cepa BL21-STAR(DE3) ou na cepa BL21(DE3) Δ slyD pRARE, realizados inóculos iniciais em meio LB, contendo 100 μ g/mL de ampicilina (pET22b) ou 50 μ g/mL canamicina (pET28b) e mantidos a 37 °C sob agitação de 200 rpm durante 16 horas. Posteriormente, 1 % do inóculo inicial foi utilizado para realização de cultivos de volumes maiores de meio LB entre 50 mL a 1 L, com suplementação dos antibióticos, e mantidos a 30 °C sob agitação de 200 rpm até atingirem a DO₆₀₀ de 0,6-0,8. A indução foi realizada com 0,1 mM ou 0,5 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) e as culturas foram mantidas a 16 °C durante 16 horas.

3.11.2 Expressão da osteopontina e de GST em *E. coli* BL21-STAR(DE3)

As construções referentes à osteopontina previamente subclonada no vetor pGEX-4T1, o vetor vazio pGEX-4T1 (GST) e a osteopontina fusionada à EGFP subclonada no vetor pET28a-TEV foram transformados concomitantemente com o plasmídeo pRARE (suplementação de códons raros) em *E. coli* BL21-Star(DE3).

O inóculo da osteopontina subclonada no vetor pGEX-4T1 e do vetor vazio pGEX-4T1 foi composto por 200 mL de meio LB e 100 μ g/mL de ampicilina. Já o inóculo da osteopontina fusionada à EGFP em vetor pET28a-TEV foi composto por 1 L de meio LB e 50 μ g/mL de canamicina. As culturas foram mantidas a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Após isso, foi feita a indução com 0,5 mM de IPTG e mantidas a 18°C durante 16 horas.

3.11.3 Expressão de EGFP em *E. coli* BL21-STAR(DE3)

O gene que codifica EGFP subclonado no vetor pDEST17 foi cedido pela Dra. Priscila Hiraiwa, com a finalidade de ser utilizado como controle negativo nos ensaios de inibição da osteopontina em cultura de células e de termoforese em microescala. Esta construção foi transformada em *E. coli* BL21-Star(DE3) e

submetida a inóculo contendo 1 L de meio LB e 100 µg/mL de ampicilina. A cultura foi mantida a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Após isso, foi feita a indução com 0,5 mM de IPTG e mantida a 18°C durante 16 horas.

3.11.4 Expressão de slyD em *E. coli* BL21-STAR(DE3)

A proteína slyD será utilizada como controle positivo de *Western blot* em relação ao anticorpo anti-hexa-histidina nos testes de reconhecimento da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos em *Western blot*, devido a apresentar hexa-histidina. Foi realizada a transformação de slyD subclonada em pET28a em *E. coli* BL21-Star(DE3), com posterior inóculo de 200 mL de meio LB e 50 µg/mL de canamicina, mantido a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Após isso, foi feita indução com 0,5 mM de IPTG durante 4 horas a 37 °C.

3.12 PREPARO DOS EXTRATOS CELULARES

3.12.1 Lise das células por sonicação

A lise das células das culturas induzidas com o volume de até 200 mL foi realizada através do uso de sonicador. As células dos experimentos de expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv, da slyD, da osteopontina fusionada à GST e de GST foram coletadas por centrifugação a 5000 g a 4 °C por 10 minutos. As células dos fragmentos de anticorpos e da slyD foram ressuspensas em solução de lise contendo 50 mM Tris HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM de β-mercaptoetanol e 0,5 mM de PMSF na proporção de 2 mL de solução para cada grama de célula, as amostras foram incubadas com 100 µg/mL de lisozima durante 1 hora, a 4 °C, e foi adicionada a elas em proporção 1:1 solução de lise com adição de 2 % de Triton X-100. Enquanto que as células da osteopontina fusionada à GST e de GST foram ressuspensas em solução de lise contendo 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10 % Glicerol, 0,2 mM DTT, 1 mM PMSF e 2 mM benzamidina (pH 7,8) na mesma proporção. A lise das células foi realizada através de sonicação de seis ciclos de 20 segundos e amplitude de 25 %, através do equipamento *ultrasonic homogenizer 4710 (Cole-Parmer)*. As amostras foram centrifugadas a 7000 g a 4 °C por 10 minutos e os sobrenadantes contendo os extratos solúveis coletados. Aos precipitados foram adicionados 4 mL de solução para lavagem dos corpos de

inclusão (solução de lise com adição de 2% de Triton X-100 e 1,5 M de NaCl), novamente sonicados e centrifugados. Os sobrenadantes correspondentes às lavagens foram coletados e os precipitados correspondentes às frações insolúveis ressuspensos em solução de lise. Os resultados dos testes de expressão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.12.2 Lise das células por microfluidificador

As culturas provenientes da indução de 1 L foram coletadas e centrifugadas a 5000 g a 4 °C por 10 minutos. As células dos experimentos de expressão da osteopontina fusionada à EGFP e de EGFP foram ressuspensas em solução contendo 50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl e 15 mM imidazol, na proporção de 2 mL de solução para cada grama de célula, enquanto que as células dos experimentos de expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv foram ressuspensas em solução contendo Tris HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%, na mesma proporção. A lise das células foi feita através de microfluidificador (Microfluidics, M110L), em doze ciclos com pressão de 80 psi. As amostras foram centrifugadas a 30000 g durante 20 minutos a 4°C e os sobrenadantes correspondentes às frações solúveis foram coletados para posteriores purificações.

3.13 ENSAIOS DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO

Os corpos de inclusão isolados a partir de culturas de 200 mL em *E. coli* BL21-Star(DE3) dos fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv foram submetidos a tratamentos de solubilização com diferentes concentrações de ureia (2 M, 4 M e 6 M) em solução contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 5 mM de DTT, em proporção de 10 mg/mL dos corpos de inclusão. Foram mantidos a 20 °C sob agitação durante 16 horas. Posteriormente, foram centrifugados a 14000 rpm durante 10 minutos e os corpos de inclusão dissolvidos foram armazenados e analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 13 %.

Para a renaturação dos corpos de inclusão, realizou-se diálise de forma a obter concentração final de ureia 1 M em solução contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 % glicerol e 0,2 mM DTT, durante 16 horas, sob agitação a 4 °C.

Após sedimentação de agregados através de centrifugação, os corpos de inclusão renaturados foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 13 %.

3.14 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.14.1 Purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado

Considerando que todos os fragmentos de anticorpos do tipo scFv apresentam hexa-histidina na região C-terminal, sua purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade a níquel imobilizado. Em paralelo também foi realizada a purificação de slyD subclonada em pET28a, a qual também está em fusão com hexa-histidina.

3.14.1.1 Testes de purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv e slyD através de sedimentação por centrifugação

Para a purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv e da proteína slyD, os extratos das culturas provenientes da indução de 200 mL foram incubados com resina de níquel (QIAGEN) pré-equilibrada com tampão de ligação (Tris HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, 10% glicerol e 1 mM PMSF) durante 16 horas a 4 °C sob agitação. A resina foi sedimentada por centrifugação a 250 g, a 4 °C por 5 minutos, e lavada três vezes com 1 mL de solução contendo Tris HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, 10% glicerol, 1 mM PMSF e 20 mM de imidazol. Foram realizadas três eluições com 500 µL de solução contendo Tris HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, 10% glicerol, 1 mM PMSF e 500 mM de imidazol. Para cada etapa de eluição ou lavagem, a resina foi sedimentada por centrifugação a 250 g, a 4 °C por 5 minutos. A resina resultante foi ressuspensa em 100 µL de tampão de ligação. O conteúdo das purificações foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.14.1.2 Testes de purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv através de coluna

Para a purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv induzidos a uma escala maior de 1 L, a purificação foi feita através da utilização de coluna de polipropileno da Bio-Rad, por gravidade. Os extratos previamente incubados com

200 µL de resina de níquel (QIAGEN) foram adicionados às colunas, estas foram lavadas com 12 ou 15 mL de solução contendo Tris-HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% e 1 mM PMSF, e eluídas cinco vezes com 500 µL de solução Tris-HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% e imidazol 500 mM ou 400 mM. O conteúdo das purificações foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.14.2 Purificação de GST-OPN e GST por cromatografia de afinidade com glutationa-Sepharose

As purificações da osteopontina subclonada em fusão com GST no pGEX-4T1 e do vetor pGEX-4T1 vazio foram realizadas através da utilização da resina de glutationa-Sepharose 4B (Amersham Biosciences). A purificação foi realizada utilizando protocolo semelhante ao descrito para cromatografia de afinidade a metal imobilizado com uso de tubos Eppendorf, porém com soluções diferentes. O tampão de ligação continha 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10% Glicerol, 0,2 mM DTT, 1 mM PMSF e 2 mM benzamidina (pH 7,8), o tampão de lavagem 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10% Glicerol, 1 mM PMSF e 2 mM benzamidina (pH 7,5), e o tampão de eluição 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10% Glicerol, 1 mM PMSF e 2 mM benzamidina e 10 mM de glutationa reduzida (pH 7,5). Alíquotas das frações das purificações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.14.3 Purificação de EGFP-OPN e EGFP utilizando o sistema semi-automatizado ÄKTA

As purificações da osteopontina fusionada à EGFP e da proteína EGFP foram realizadas através dos cromatógrafos ÄKTA *pure* e ÄKTA UPC100 (GE Healthcare), com a utilização de coluna His Trap HP 5 mL.

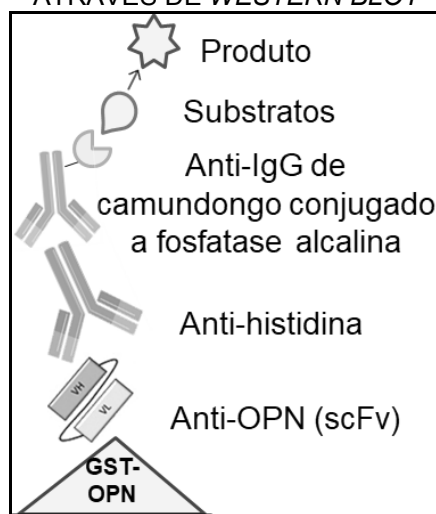
No sistema previamente equilibrado com tampão de ligação contendo 50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl e 15 mM imidazol, a fração solúvel previamente submetida a lise por microfluidificador foi injetada a um fluxo de 0,5 mL/min, e feita lavagem de contaminantes com 10 mL da mesma solução. Para a eluição foi utilizada solução contendo 50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl e 400 mM imidazol, sendo utilizado gradiente de dois passos: 0 a 12,5% de imidazol em 50 mL de

tampão, e 12,5% a 100% em 50 mL de tampão, a um fluxo de 1 mL/min. Foram coletadas frações de 1,5 mL e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.15 ENSAIOS DE ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS ATRAVÉS DE *WESTERN BLOT*

O reconhecimento da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv foi realizado através de ensaios de *Western blot* (FIGURA 7). Para isso, 50 ng da osteopontina fusionada à GST foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida e transferida para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram bloqueadas em solução contendo tampão fosfato-salino, composto de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na_2HPO_4 e 1,5 mM de KH_2PO_4 (PBS), 0,05% Tween 20 e 5 % de leite em pó, foram incubadas com aproximadamente 5 $\mu\text{g/mL}$ dos anticorpos recombinantes anti-osteopontina purificados (scFv) em solução PBS a 4 °C sob agitação durante 16 horas, posteriormente foram lavadas três vezes durante 5 minutos com solução PBS + 0,05% Tween 20 e incubadas com 1,2 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo anti-histidina produzido em camundongo (MAB050, R&D Systems) em solução PBS e 5% de leite em pó, durante 2 horas sob agitação, e por último, foram lavadas novamente e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (61-6522, Invitrogen) em diluição 1:5000 em solução PBS + 0,05% Tween 20 durante 2 horas, sob agitação. A revelação foi feita de forma colorimétrica, através da utilização dos substratos *nitro blue tetrazolium* (NBT) e *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (BCIP), conforme protocolo da Sigma-Aldrich, em solução de 100 mM Tris HCl pH 9,5, 100 mM NaCl e 5 mM MgCl_2 . Em paralelo também foram realizados dois ensaios de *Western blot* controles, através da incubação somente com os anticorpos anti-histidina e anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina, e apenas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina, sem, portanto, a incubação com os fragmentos de anticorpos do tipo scFv.

FIGURA 7 - ESQUEMA DO ENSAIO DE ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS ATRAVÉS DE WESTERN BLOT



Esquema demonstrando o ensaio de reconhecimento da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos através de *Western blot*. A GST-OPN submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida é transferida para membrana de PVDF. A membrana é incubada com os anticorpos anti-OPN (scFv), lavada com PBS + 0,05% Tween 20, incubada com anticorpo anti-histidina, lavada novamente, e por último, incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina. Em seguida são adicionados os substrato NBT e BCIP para gerar o produto, revelado de forma colorimétrica.

3.16 ENSAIO DE INTERAÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS E DA OSTEOPONTINA ATRAVÉS DE TERMOFORESE EM MICROESCALA

A análise da interação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv com a osteopontina também foi realizada através da técnica de termoforese em microescala (*microscale thermophoresis*, MST).

A técnica tem como princípio analisar o movimento das moléculas quando submetidas a um gradiente de temperatura. O gradiente é gerado por um laser infravermelho (IR), cuja radiação as moléculas de água presentes na solução da amostra conseguem absorver, o que desencadeia o fluxo de moléculas. Esse fluxo é decorrente de mudanças de tamanho, carga ou conformação que podem ocorrer quando as moléculas interagem (JERABEK-WILLEMSEN et al., 2011; SEIDEL et al., 2013).

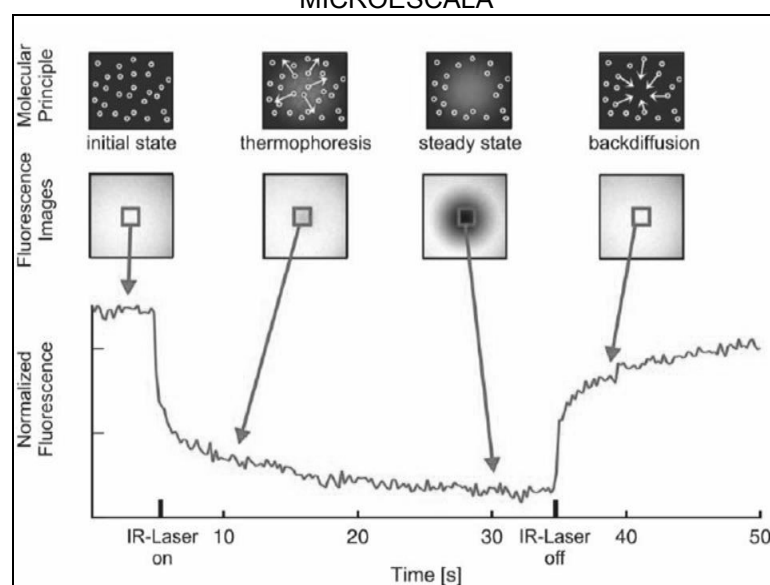
A quantificação da interação é feita através da quantificação de fluorescência emitida pelas moléculas, tornando-se necessário que uma das moléculas esteja ligada a um marcador fluorescente.

O equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) utilizado para esta técnica é constituído de uma luz visível usada para excitação do fluoróforo, e de um laser infravermelho acoplado no mesmo caminho dessa luz. Com isso, é possível

medir a intensidade de fluorescência no mesmo ponto em que a radiação IR é focada na amostra, gerando o fluxo das moléculas (SEIDEL et al., 2013).

Os gráficos referentes à interação das moléculas são gerados de forma a calcular a fluorescência relativa sobre o tempo em segundos, como pode ser observado na FIGURA 8. É possível também observar os intervalos de tempo referentes aos estados de salto de temperatura (*temperature jump*, *T jump*), e de termoforese. O salto de temperatura se refere ao estado do primeiro segundo em que o laser IR é ativado, já o fluxo das moléculas através do gradiente de temperatura se refere ao estado da termoforese (JERABEK-WILLEMSEN et al., 2011), sendo esta geralmente avaliada no intervalo de tempo que apresenta maior distância calculada entre as duas curvas geradas referentes à proteína com ligante e à proteína sem ligante.

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DO ENSAIO DE TERMOFORESE EM MICROESCALA



FONTE: NanoTemper Technologies GmbH, 2007. A fluorescência normalizada é projetada em função do tempo de experimento em segundos. O laser infravermelho está inicialmente desligado (estado inicial). Quando o laser IR é ativado, ocorre o fluxo das moléculas através do gradiente de temperatura (termoforese). A fluorescência diminui à medida em que a temperatura aumenta, pois as moléculas que formam complexos afastam-se do local aquecido. Quando o laser IR é desligado, as partículas se difundem novamente.

Foi analisada a interação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 à osteopontina fusionada à EGFP, e à EGFP, como experimento controle. Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv purificados a partir de uma indução de 1 L estavam em solução Tris HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% e 500 mM de imidazol, enquanto que a osteopontina fusionada à EGFP e

a EGFP purificadas foram submetidas a diálise, sendo constituídas em uma solução final de tampão fosfato-salino (PBS), composto de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na_2HPO_4 e 1,5 mM de KH_2PO_4 , pH 7,4.

As concentrações de osteopontina fusionada à EGFP e de EGFP definidas para o ensaio foram de 12 nM e 15 nM, enquanto que para os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv e da proteína ovalbumina, utilizada como controle negativo de ligação, foi de 1 e 1,1 μM . Foi realizado um pré-teste para a amostra da osteopontina na solução em que os fragmentos de anticorpos do tipo scFv estavam, com a finalidade de verificar se a solução é compatível para a realização dos ensaios de interação e se não ocorre agregação. Cada ensaio de verificação de interação foi realizado em quadruplicata, através da utilização de quatro capilares contendo a proteína alvo (EGFP-OPN) como controle, e quatro capilares contendo a proteína alvo com adição dos ligantes (scFv) ou do controle (ovalbumina). Os mesmos ensaios foram realizados com a proteína alvo EGFP, atuando como controle negativo.

Para calcular a constante de dissociação (k_d) entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv e a osteopontina, a afinidade de ligação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 e de osteopontina fusionada à EGFP foi avaliada. Também foi analisada a especificidade da ligação da osteopontina, através da análise da afinidade de ligação entre EGFP-OPN com o controle negativo scFv anti-HBsAg. Para estas análises foram realizadas diluições seriadas dos fragmentos de anticorpos através da concentração inicial de 2,5 μM e final de 0,00008 μM , resultando em 16 concentrações diferentes. Em cada concentração foi adicionado 0,015 μM de osteopontina fusionada à EGFP. Os experimentos foram realizados em triplicata. As curvas geradas foram analisadas para se avaliar a constante de dissociação (k_d).

3.17 TESTES DE LIGAÇÃO DA OSTEOPONTINA AOS SEUS RECEPTORES CELULARES

O teste de ligação da osteopontina aos seus receptores celulares foi feito com a linhagem celular THP-1, derivada de leucemia mieloide aguda (ATCC® TIB-202™), submetida à diferenciação com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), e incubação com a osteopontina recombinante fusionada à EGFP e a proteína EGFP

como controle negativo. Através deste ensaio, busca-se avaliar por citometria de fluxo a ligação da osteopontina a estas células e o nível de inibição que os fragmentos de anticorpos recombinantes podem oferecer.

A citometria de fluxo possibilita a análise de células marcadas com fluorescência a partir de uma população mista, através de seu movimento induzido por uma luz originada de uma fonte de excitação, como um laser. A emissão da fluorescência é proporcional à quantidade de sonda fluorescente ligada à célula, enquanto que a luz é diretamente relacionada às características morfológicas e estruturais da célula. Há dois tipos de dispersão de luz: dispersão lateral de luz (SSC), o qual é proporcional à granulosidade ou complexidade celular, e dispersão frontal de luz (FSC), o qual é proporcional à área ou tamanho celular (ADAN et al., 2016). Através desta técnica é possível quantificar a porcentagem de células fluorescentes, as quais apresentaram a osteopontina fusionada à EGFP ligada aos receptores celulares e avaliar a atuação dos fragmentos de anticorpos como competidores da ligação aos seus receptores.

3.17.1 Cultivo celular

As células da linhagem THP-1 foram cultivadas em garrafas de 75 cm² em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), a 37°C em incubadora com atmosfera de 5% CO₂.

Para o teste de ligação da osteopontina, as células foram cultivadas em placas de seis poços ou placas de Petri (35 x 10 mm), na concentração de 0,25 x 10⁶ células/mL, e diferenciadas com 100 nM de PMA durante 48 horas. Após a diferenciação, as células foram incubadas com 10 nM, 100 nM e 250 nM das proteínas EGFP (controle negativo) ou EGFP-OPN durante duas horas em meio livre de soro (Opti-MEM™ I, Gibco®) pH 7,4. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 2 mL de PBS pH 7,4 e subsequentemente ressuspensas em 1 mL de tampão PBS-EDTA 5 mM pH 7,4. Após centrifugação a 500 g por 5 minutos, as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS para análise no citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II (BD Biosciences). Também foi realizado um ensaio controle com as células diferenciadas sem a adição de proteínas. Os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo v10.4.2.

3.17.2 Teste de estabilidade das proteínas

Foi realizado um teste para verificar o tempo no qual as proteínas EGFP-OPN e EGFP conseguem se manter estáveis quando incubadas em meio de cultura com as células.

Para isso, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,25 \times 10^6$ células/mL, em 500 μ L de meio de cultura e diferenciadas com 100 nM de PMA durante 72 horas. Após a diferenciação, as células foram incubadas com 1 μ M das proteínas EGFP ou EGFP-OPN em meio livre de soro (Opti-MEM™ I, Gibco®) pH 7,4. Também foi realizado um experimento controle, através da utilização de células diferenciadas e sem a adição de proteínas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados nos tempos de 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas e centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos. 20 μ L dos sobrenadantes foram analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida.

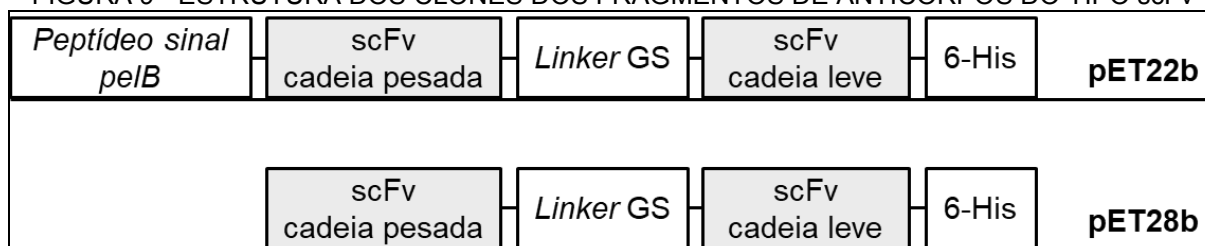
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VETORES DE EXPRESSÃO CONSTRUÍDOS

4.1.1 Confirmação dos plasmídeos contendo os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv por digestão com enzimas de restrição

As cadeias leves e pesadas dos anticorpos recombinantes do tipo scFv são unidas através da sequência peptídica de 20 aminoácidos contendo glicina e serina, com a finalidade de fornecer flexibilidade à estrutura. Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados no vetor de expressão pET22b contém o peptídeo-sinal *pelB* de endereçamento para o periplasma na região N-terminal e hexa-histidina na região C-terminal. Nas construções de fragmentos do tipo scFv subclonados em pET28b, o peptídeo sinal é ausente, contendo apenas a hexa-histidina na região C-terminal (FIGURA 9).

FIGURA 9 - ESTRUTURA DOS CLONES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv



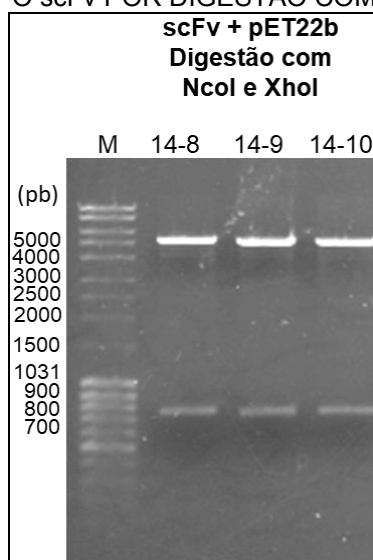
Esquema demonstrando estrutura dos clones dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv. Os genes que codificam a cadeia pesada e a leve são unidos através de um *linker* contendo glicinas (G) e serinas (S). Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados no vetor pET22b contém o peptídeo-sinal *pelB* de endereçamento para o periplasma na região N-terminal. Os fragmentos de anticorpos subclonados nos vetores pET22b e pET28b apresentam hexa-histidina na região C-terminal.

A análise do DNA de colônias transformantes dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados nos vetores de expressão pET22b e pET28b foi realizada através de digestão com as enzimas de restrição NcoI e XhoI e eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados no vetor pET22b foram encontrados aproximadamente em seus tamanhos esperados de 797 pb (FIGURA 10). Já a eletroforese em gel de agarose 1% realizada para análise do DNA das colônias transformantes dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados no vetor pET28b (FIGURA 11) apresentou distorção, entretanto, ainda é possível observar a migração destes nos tamanhos esperados de

aproximadamente 797 pb. Esses resultados confirmam que os três fragmentos de anticorpos do tipo scFv foram clonados nos vetores de expressão de forma correta.

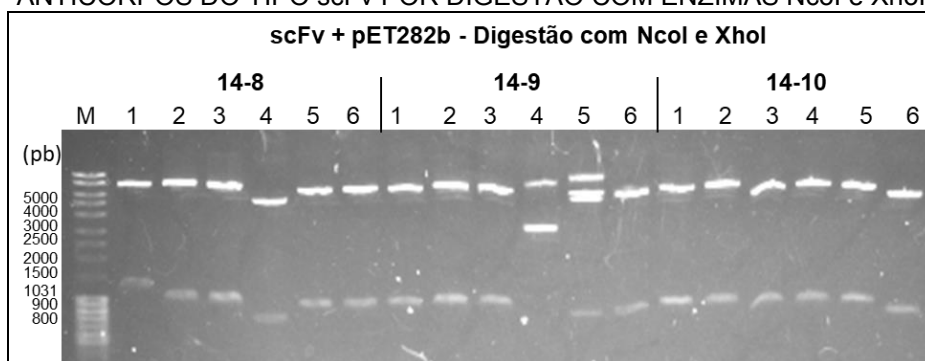
Os genes que codificam os fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados em pET22b também foram analisados por sequenciamento de DNA, sendo confirmada a clonagem correta no vetor.

FIGURA 10 – ANÁLISE DO PLASMÍDEO pET22b CONTENDO OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv POR DIGESTÃO COM ENZIMAS NcoI e XhoI



Gel de agarose 1% para análise da digestão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 subclonados em pET22b por digestão com as enzimas de restrição NcoI e XhoI. Tamanho dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv: 797 pb. Marcador de DNA: MassRuler.

FIGURA 11 – ANÁLISE DO PLASMÍDEO pET28b CONTENDO OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv POR DIGESTÃO COM ENZIMAS NcoI e XhoI

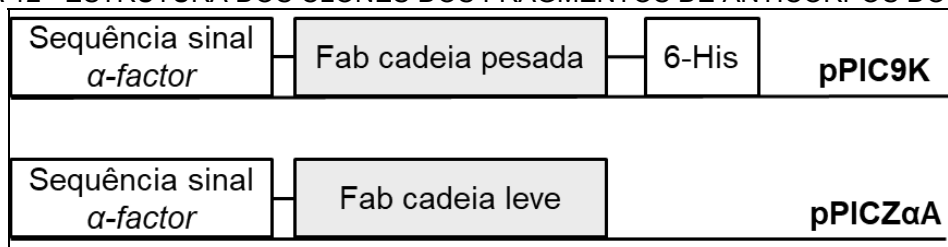


Gel de agarose 1% para análise do DNA de seis colônias transformantes dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 subclonados em pET28b por digestão com as enzimas de restrição NcoI e XhoI. Tamanho dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv: 797 pb. Marcador de DNA: MassRuler.

4.1.2 Confirmação dos plasmídeos contendo os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo Fab por digestão com enzimas de restrição

Os genes sintéticos que codificam as cadeias pesadas dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab subclonados no vetor pPIC9K contém sequência sinal para endereçamento do gene do fator- α de *Saccharomyces cerevisiae* na região N-terminal, e hexa-histidina na região C-terminal. Já os genes sintéticos que codificam as cadeias leves dos fragmentos do tipo Fab subclonados no vetor pPICZ α A não contém hexa-histidina, mas contém a sequência sinal para endereçamento do gene do fator- α na região N-terminal (FIGURA 12).

FIGURA 12 - ESTRUTURA DOS CLONES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab

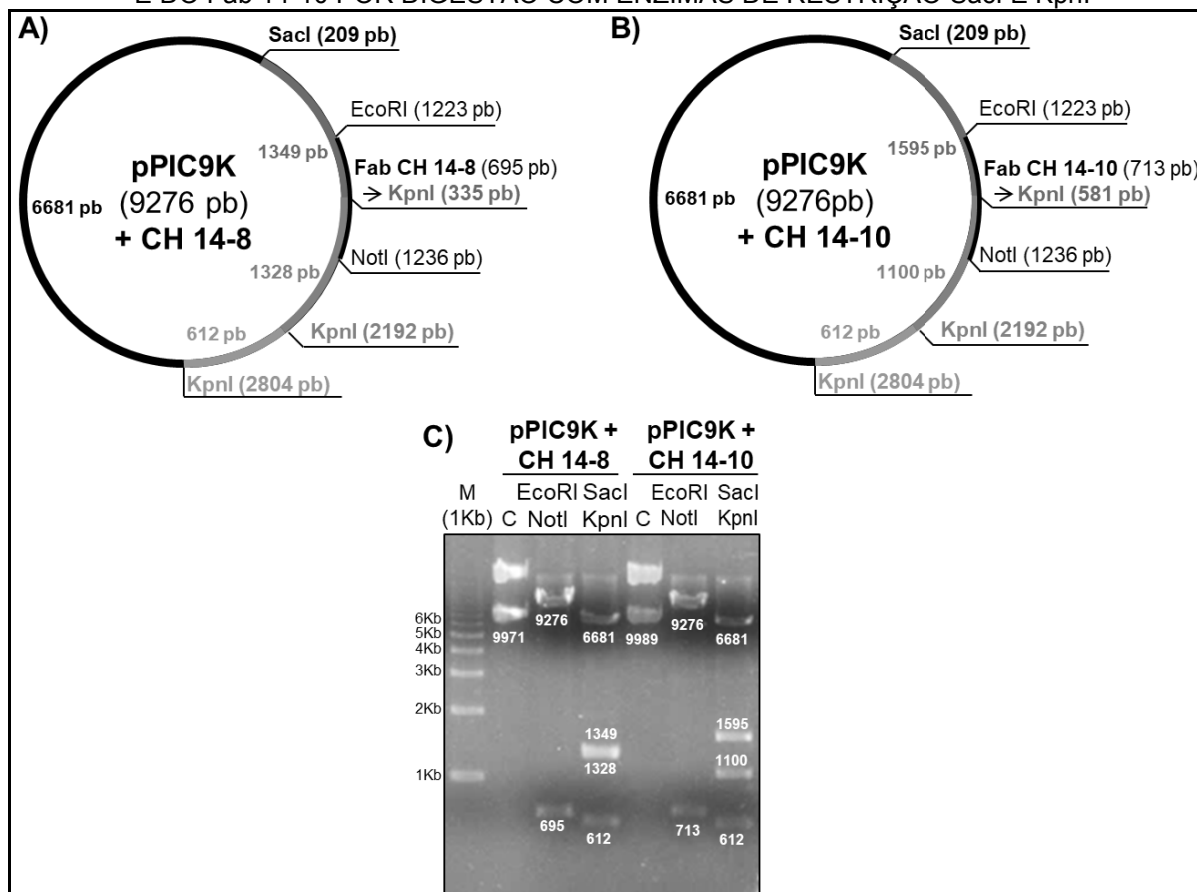


Esquema demonstrando estrutura dos clones dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab. Os genes sintéticos que codificam as cadeias pesadas dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab foram subclonados no vetor pPIC9K, em fusão com hexa-histidina na região C-terminal. Os genes sintéticos que codificam as cadeias leves foram subclonados no vetor pPICZ α A. Ambos os vetores apresentam sequência sinal para endereçamento do gene do fator- α de *Saccharomyces cerevisiae* na região N-terminal.

As construções gênicas dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab que foram inseridas nos seus respectivos vetores entre os sítios de EcoRI e NotI foram analisadas por digestão com enzimas de restrição. Para as cadeias pesadas dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab 14-8 e 14-10, foram utilizadas as enzimas de restrição SacI e KpnI, as quais digerem os genes sintéticos e o vetor pPIC9K (FIGURAS 13A e 13B). As cadeias leves, as quais foram inseridas no vetor pPICZ α A, foram digeridas com a enzima HincII, conforme mostra o mapa de tamanho esperado das bandas digeridas (FIGURAS 14A e 14B). Os tamanhos esperados correspondentes às digestões para cada cadeia foram confirmados através de eletroforese em gel de agarose (FIGURAS 13C E 14C). É possível confirmar através das análises realizadas que cada cadeia foi clonada em seu respectivo vetor de forma correta.

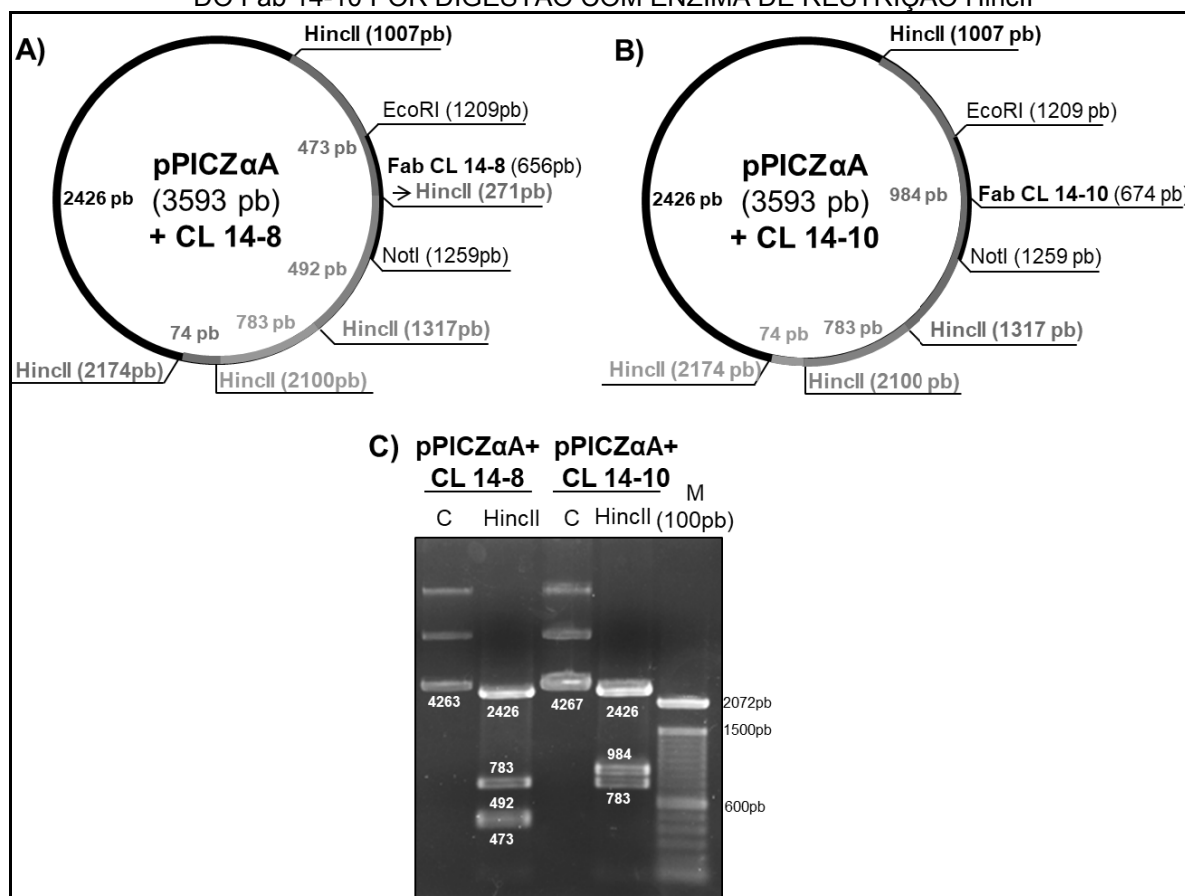
Os plasmídeos também foram analisados por sequenciamento de DNA, realizado pela Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – FIOCRUZ, confirmando a inserção correta de cada cadeia em seu respectivo vetor.

FIGURA 13 - ANÁLISE DO PLASMÍDEO pPIC9K CONTENDO AS CADEIAS PESADAS DO Fab 14-8 E DO Fab 14-10 POR DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO SacI E KpnI



13A: Mapa do vetor pPIC9K com a inserção da cadeia pesada (CH) do Fab 14-8, demonstrando os fragmentos esperados de 6681 pb, 1349 pb, 1328 pb e 612 pb para a digestão com as enzimas de restrição SacI e KpnI. 13B: Mapa do vetor pPIC9K com a inserção da cadeia pesada (CH) do Fab 14-10, demonstrando os fragmentos esperados de 6681 pb, 1595 pb, 1100 pb e 612 pb para a digestão com as enzimas de restrição SacI e KpnI. 13C: Gel de agarose 1 % para análise dos vetores circulares (C) contendo as cadeias pesadas dos fragmentos Fab 14-8 e Fab 14-10 e suas digestões com as enzimas SacI e KpnI, e EcoRI e NotI. Tamanho da cadeia pesada do Fab 14-8: 695 pb. Tamanho da cadeia pesada do Fab 14-10: 713 pb.

FIGURA 14 - ANÁLISE DO PLASMÍDEO pPICZ α A CONTENDO AS CADEIAS LEVES DO Fab 14-8 E DO Fab 14-10 POR DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO HincII



14A: Mapa do vetor pPICZ α A com a inserção da cadeia leve (CL) do Fab 14-8, demonstrando os fragmentos esperados de 2426 pb, 783 pb, 492 pb, 473 pb e 74 pb para a digestão com a enzima de restrição HincII. 14B: Mapa do vetor pPICZ α A com a inserção da cadeia leve (CL) do Fab 14-10, demonstrando os fragmentos esperados de 2426 pb, 984 pb, 783 pb e 74 pb para a digestão com a enzima de restrição HincII. 14C: Gel de agarose 1 % para análise dos vetores circulares (C) contendo as cadeias leves dos fragmentos Fab 14-8 e Fab 14-10 e suas digestões com as enzimas HincII. Tamanho da cadeia leve do Fab 14-8: 656 pb. Tamanho da cadeia leve do Fab 14-10: 674 pb.

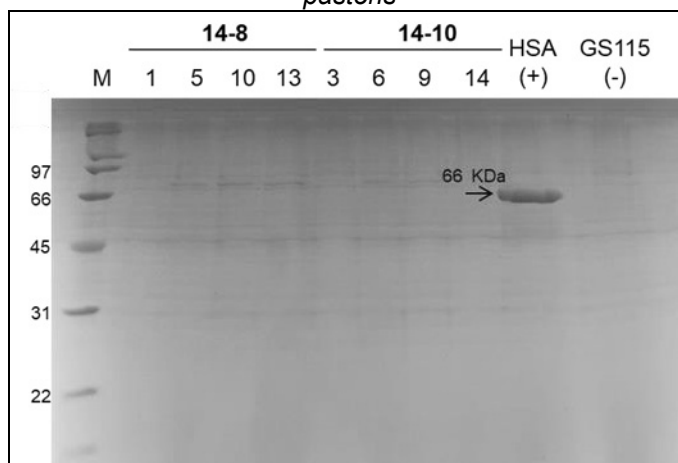
4.2 SELEÇÃO DE MÚLTIPLAS CÓPIAS DOS TRANSFORMANTES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab EM *Pichia pastoris*

As cadeias leves e pesadas dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab foram co-transformadas em *P. pastoris*. Foi realizado um teste de expressão utilizando quatro colônias transformantes de cada Fab com indução em 85 mL de meio BMMY. Os sobrenadantes do terceiro dia foram coletados e concentrados por precipitação com TCA 10 %.

Não ocorreu a expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab 14-8 e 14-10, os quais deveriam aparecer no gel migrando com aproximadamente 30 kDa (FIGURA 15). Entretanto, é possível concluir que o experimento de indução

funcionou, pois observa-se a expressão do controle positivo albumina sérica humana (HSA), em seu tamanho de aproximadamente 66 kDa.

FIGURA 15 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO Fab 14-8 E 14-10 EM *P. pastoris*



Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de Coomassie para análise da expressão de quatro colônias dos fragmentos de anticorpos do tipo Fab 14-8 e 14-10. Controle positivo de indução: albumina sérica humana (HSA). Controle negativo de indução: Cepa GS115, sem plasmídeo. Seta indica a expressão de HSA. M: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (Bio-Rad).

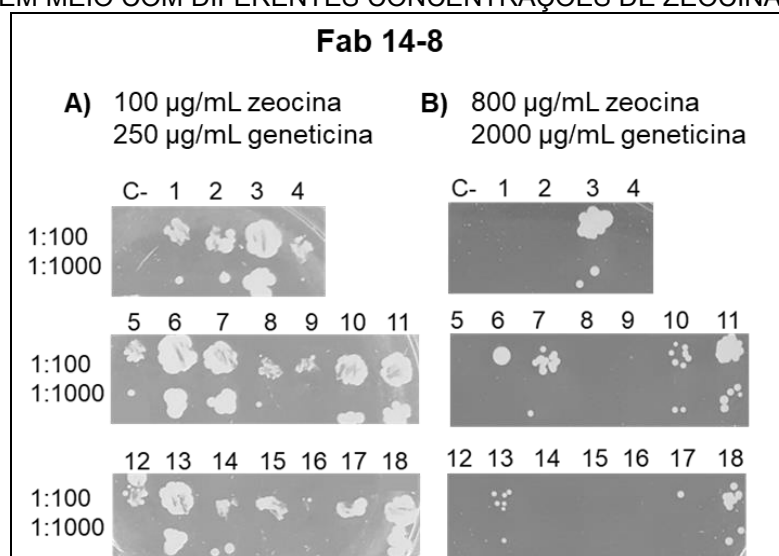
Uma hipótese para os fragmentos de anticorpos do tipo Fab não terem sido expressos é devido às colônias utilizadas apresentarem um baixo número de cópias do cassete de expressão do vetor integrado em seu genoma, o que pode reduzir a taxa de expressão de proteínas.

Na tentativa de obtenção da expressão dos anticorpos, foi realizada a seleção de clones que contém múltiplas cópias do cassete de expressão. Através dessa seleção, é possível comparar o crescimento das colônias e verificar quais destas conseguem crescer em concentração mais alta de antibiótico, pois se espera que estas apresentem um maior número de cópias integradas no genoma que as possibilitariam a crescer nessas condições, e por apresentarem mais cópias, que a produção de proteína de interesse aumente.

As colônias transformantes contendo os fragmento Fab 14-8 e 14-10 foram cultivadas em meio MD contendo duas diferentes concentrações de zeocina e geneticina (100 µg/mL de zeocina e 250 µg/mL de geneticina; 800 µg/mL de zeocina e 2000 µg/mL de geneticina) para a seleção dos vetores pPICZαA e pPIC9K, respectivamente. A cepa GS115 sem o plasmídeo também foi utilizada como controle negativo deste experimento. Todas as colônias, com exceção do controle negativo, cresceram na diluição de 1:100 nas concentrações de 100 µg/mL de

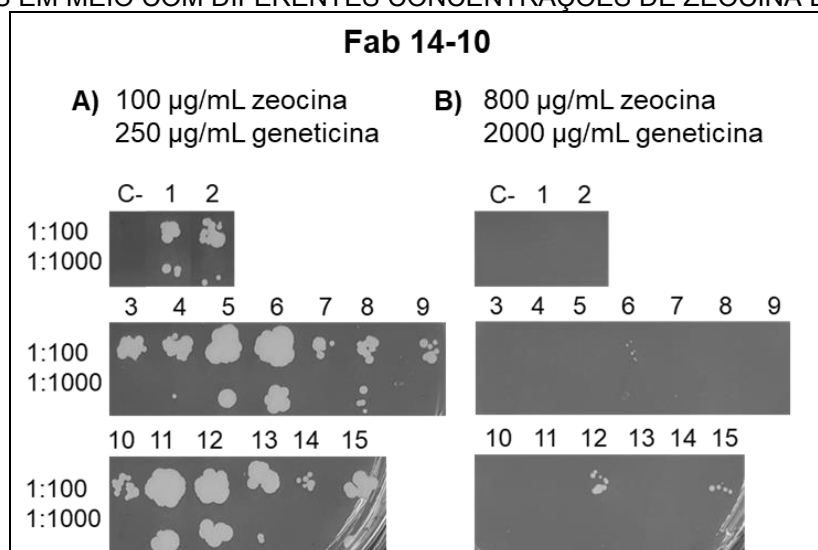
zeocina e 250 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina (FIGURA 16A e FIGURA 17A). Nas concentrações mais altas de antibióticos, oito colônias do fragmento de anticorpo do tipo Fab 14-8 sobreviveram (3, 6, 7, 10, 11, 13, 17 e 18) (FIGURA 16B), enquanto que para as colônias do Fab 14-10 apenas três sobreviveram (6, 12 e 15) (FIGURA 17B).

FIGURA 16 - TESTE DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS CONTENDO O FRAGMENTO Fab 14-8 CULTIVADAS EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZEOCINA E GENETICINA



16A: Colônias do Fab 14-8 crescidas em meio MD com 100 $\mu\text{g/mL}$ de zeocina e 250 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina em diluições 1:100 e 1:1000. 16B: Colônias do Fab 14-8 crescidas em meio MD com 800 $\mu\text{g/mL}$ de zeocina e 2000 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina em diluições 1:100 e 1:1000. Controle negativo (C-): GS115.

FIGURA 17 - TESTE DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS CONTENDO O FRAGMENTO Fab 14-10 CULTIVADAS EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZEOCINA E GENETICINA



17A: Colônias do Fab 14-10 crescidas em meio MD com 100 $\mu\text{g/mL}$ de zeocina e 250 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina em diluições 1:100 e 1:1000. 17B: Colônias do Fab 14-10 crescidas em meio MD com 800 $\mu\text{g/mL}$ de zeocina e 2000 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina em diluições 1:100 e 1:1000. Controle negativo (C-): GS115.

4.3 ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DOS VETORES DE *P. pastoris* POR PCR

As colônias que conseguiram crescer em concentrações mais altas dos antibióticos testados foram analisadas para confirmação da integração do cassete de expressão de seus respectivos vetores no genoma da levedura *P. pastoris*.

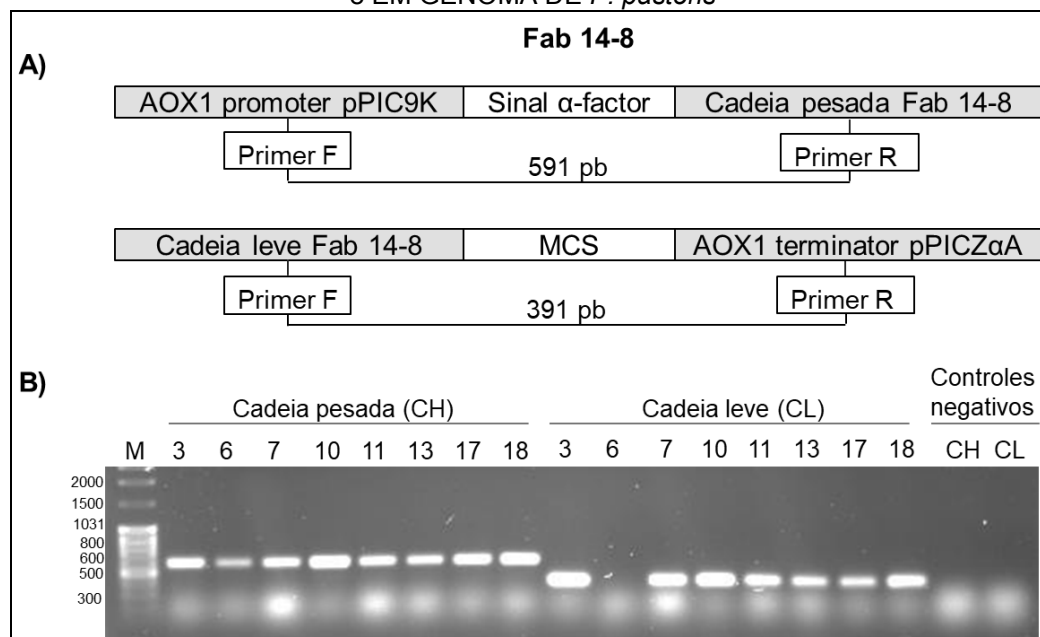
As amostras de DNA que codificam as cadeias leves ou pesadas de cada fragmento de anticorpo Fab foram amplificadas por PCR utilizando primers específicos (FIGURA 18A e FIGURA 19A). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

O gene que codifica a cadeia pesada do Fab 14-8 foi detectado no tamanho esperado de aproximadamente 591 pb em todas as colônias testadas (FIGURA 18B), confirmando que estas colônias possuíam a cadeia pesada deste Fab integrada em seu genoma. Enquanto que sete amostras de DNA que codificam a cadeia leve do Fab 14-8 migraram no tamanho esperado de aproximadamente 391 pb, e portanto, foram integradas nos genomas da levedura, e apenas uma amostra de DNA (extraída da colônia 6) não apresentou esta integração.

Já para a amostra de DNA que codifica a cadeia pesada do fragmento de anticorpo 14-10, duas colônias apresentaram o fragmento de tamanho esperado de aproximadamente 712 pb (FIGURA 19B), e apenas uma não. As três amostras de DNA que codificam a cadeia leve foram amplificadas com o tamanho esperado de aproximadamente 517 pb.

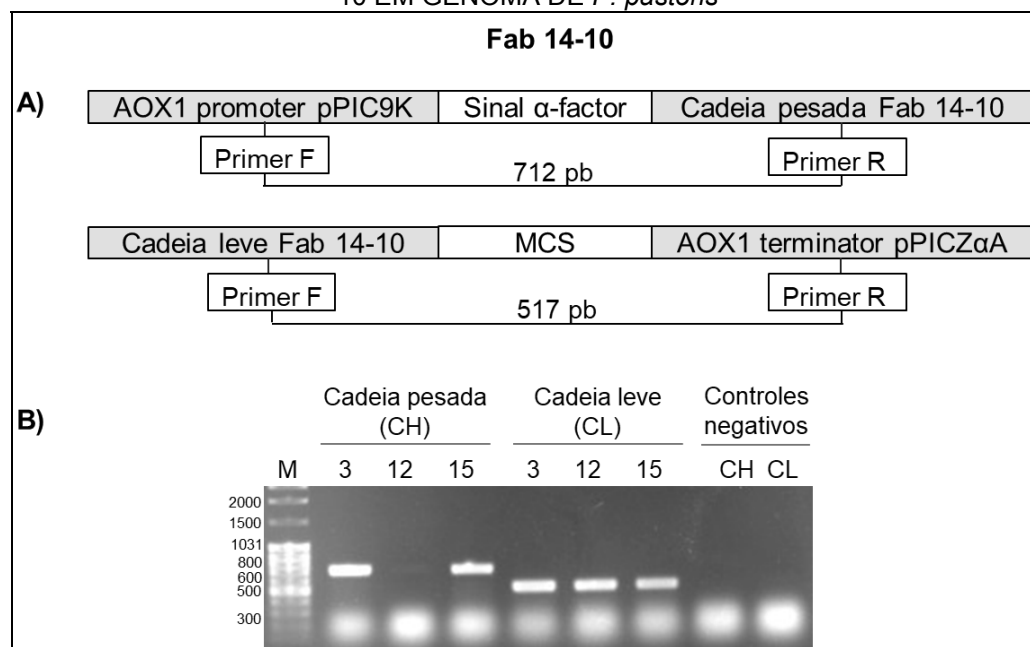
Através dessas análises é possível concluir que sete das oito colônias do Fab 14-8 apresentaram em seu genoma o cassete de expressão dos vetores do pPIC9K e pPICZ α A integrados, contendo as cadeias leves e pesadas deste Fab, enquanto que duas colônias do Fab 14-10 (3 e 15) apresentaram em seu genoma o cassete de expressão dos vetores do pPIC9K e pPICZ α integrados, contendo as cadeias leves e pesadas deste Fab.

FIGURA 18 - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DOS VETORES CONTENDO OS GENES QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab 14-8 EM GENOMA DE *P. pastoris*



18A: Esquema demonstrando a posição dos primers utilizados para amplificação das cadeias leve e pesada que codificam o Fab 14-8. 18B: Gel de agarose 1% para análise da amplificação das cadeias leve e pesada que codificam o Fab 14-8 extraídas de sete colônias.

FIGURA 19 - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DOS VETORES CONTENDO OS GENES QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO Fab 14-10 EM GENOMA DE *P. pastoris*



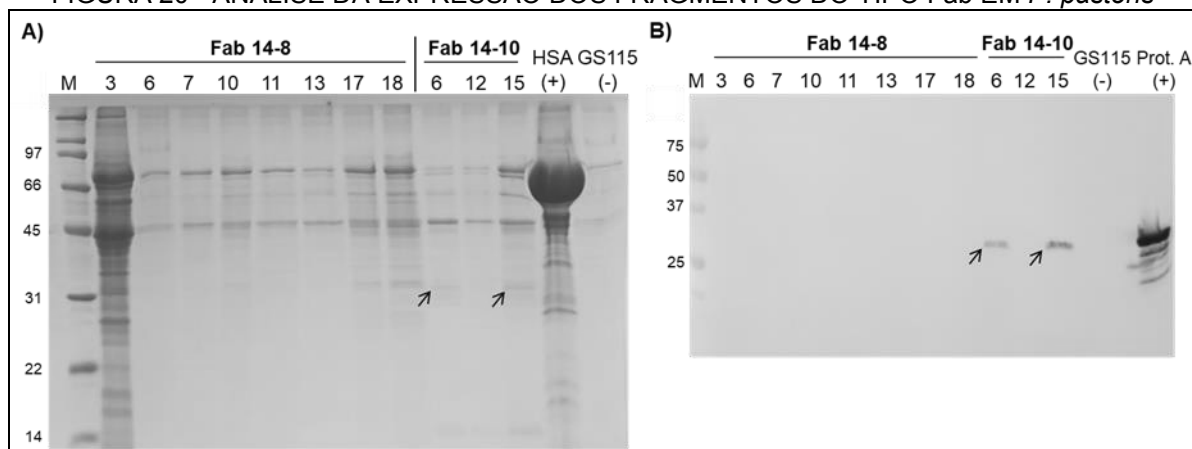
19A: Esquema demonstrando a posição dos primers utilizados para amplificação das cadeias leve e pesada que codificam o Fab 14-10. 19B: Gel de agarose 1% para análise da amplificação das cadeias leve e pesada que codificam o Fab 14-10 extraídas de três colônias.

4.4 TESTES DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO Fab EM *P. pastoris* GS115

Os transformantes que sobreviveram às concentrações mais altas de antibióticos foram testados para expressão dos fragmentos do tipo Fab em culturas de 20 mL de meio BMMY. Após indução, os sobrenadantes do quinto dia foram coletados, concentrados por precipitação com TCA 10 % e analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 13%.

Não foi possível observar a expressão do Fab 14-8 em sua massa molecular de 30 kDa (FIGURA 20), entretanto, apesar dos baixos níveis de expressão, é possível observar a banda de 30 kDa nas colônias 6 e 15 do Fab 14-10. Com isso, pode-se concluir que mesmo após a seleção de múltiplas cópias, a expressão dos fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo Fab ainda é muito baixa, quando comparada com o nível de expressão da albumina sérica humana.

FIGURA 20 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO Fab EM *P. pastoris*



20A: Gel de poliacrilamida 13 % para análise da expressão do fragmento Fab 14-8 a partir de oito colônias e do Fab 14-10 a partir de três colônias. Controle positivo de indução: albumina sérica humana (HSA). Controle negativo de indução: Cepa GS115, sem plasmídeo. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad). 20B: *Western blot* com utilização de anticorpo anti-histidina para análise da expressão do fragmento Fab 14-8 a partir de oito colônias e do Fab 14-10 a partir de três colônias. Controle positivo para *Western blot*: Proteína A. M: *Precision plus protein all blue standards* (Bio-Rad). Setas indicam a expressão do Fab 14-10 a partir das colônias 6 e 15.

Apesar das vantagens atribuídas a *Pichia pastoris*, esse sistema ainda apresenta algumas limitações para expressão de proteínas, como a baixa taxa de eficiência na integração de genes em seu genoma e a instabilidade genética de múltiplas cópias em situações de estresse.

Zhu e colaboradores (2009) testaram a estabilidade genética de clones que contém múltiplas cópias do cassete de expressão integradas no genoma da levedura e observaram que após indução com metanol durante 96 horas, a quantidade de cópias presente nos vetores de alguns transformantes testados decaiu para quase 50 %. Essa instabilidade genética pode ser um dos motivos para que mesmo que o material genético das colônias tenha sido confirmado pela integração do cassete de expressão contendo os genes sintéticos, ainda assim não ter sido capaz de produzir o fragmento de anticorpo do tipo Fab 14-8.

4.5 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE DO TIPO Fab EM *P. pastoris* GS115

Como o fragmento de anticorpo do tipo Fab 14-8 não foi produzido, prosseguiu-se com testes para otimização da produção apenas do fragmento de anticorpo recombinante do tipo Fab 14-10, para obtenção das melhores condições de produção com a finalidade de uma produção em escala maior para os ensaios funcionais. Para isso, foram testados diferentes valores de pH e tempos de indução.

O pH pode ter efeito na produção de proteases que são geralmente ativas a pH neutros (WAN et al., 2008). O manual "*Pichia Expression Kit*" da Life Technologies (2014) recomenda como padrão o pH 6,0, sendo este o pH também utilizado nos testes de expressão anteriores realizados. Para avaliar o efeito do pH na expressão do Fab 14-10, foram selecionados três valores de pH: 5,0, 6,0 e 7,4.

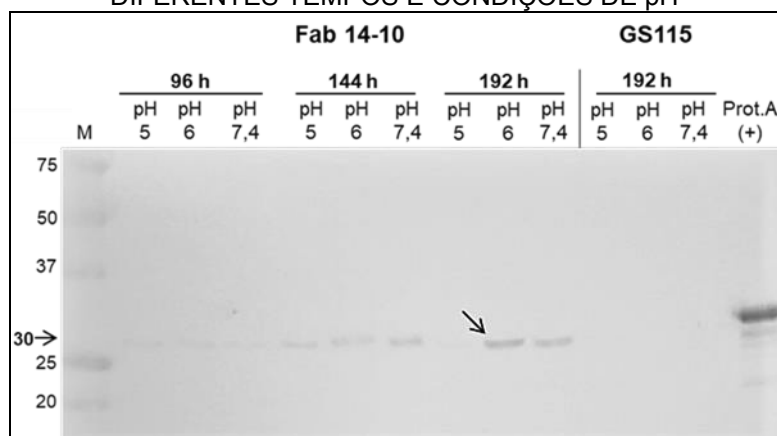
Para realização do ensaio, a colônia 15 do Fab 14-10 foi induzida em 20 mL de meio BMMY com os três valores de pH, durante 192 horas. Um mililitro das amostras de 96 horas, 144 horas e 192 horas foram coletados, concentrados por precipitação com TCA 10% e submetidos a *Western blot*.

O fragmento de anticorpo do tipo Fab 14-10 atingiu uma maior taxa de expressão de acordo com o aumento do tempo de indução (FIGURA 21). Já para os valores de pH, não foi observada uma diferença na produção do Fab entre as culturas induzidas em pH 6,0 e em 7,4, entretanto, a produção do Fab em pH 5,0 foi muito reduzida.

No trabalho de Wan e colaboradores (2008), foram testados valores de pH entre 5,0 a 8,0, com um maior rendimento obtido entre pH 6,0 a 6,5. Já no trabalho de Çalik e colaboradores (2010) foram testados valores de pH entre 4,2 a 6,0,

observando-se um aumento da concentração de proteínas em pH 5,0 e redução em pH 6,0, ao contrário do que foi encontrado para o Fab 14-10. Conclui-se, portanto, que as condições ótimas de pH e de tempo de indução para produção de uma proteína em *Pichia pastoris*, altera-se de acordo com as características da proteína de interesse, e essas condições para o Fab 14-10 foram a utilização do pH 6 e 7,4, e de um tempo maior de indução de 192 horas.

FIGURA 21 - EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO Fab 14-10 EM DIFERENTES TEMPOS E CONDIÇÕES DE pH



Western blot com utilização de anticorpo anti-histidina para análise da expressão do Fab 14-10 e do controle negativo GS115, testados em diferentes concentrações de pH (5, 6 e 7,4) e em diferentes tempos (96 horas, 144 horas e 192 horas). Controle positivo de Western blot: Proteína A. M: *Precision plus protein all blue standards* (Bio-Rad). Seta indica a expressão do Fab 14-10 em sua massa molecular esperada de 30 kDa.

Para maiores otimizações da expressão, é possível testar ainda a produção dos anticorpos em temperatura menores de indução, pois estas temperaturas podem auxiliar no enovelamento da proteína, como observado no estudo realizado por Li e colaboradores (2001), no qual o rendimento da expressão da proteína induzida a 23°C foi muito superior em comparação à indução a 30°C. Além da temperatura, também pode ser avaliado o efeito de diferentes concentrações de metanol para indução. Nos ensaios de Wan e colaboradores (2008), foram testadas cinco diferentes concentrações de metanol: 0,1%, 1%, 2%, 3% e 5%, sendo a maior produção de proteína obtida com adição de 3% de metanol.

Devido a dificuldade de expressão do fragmento de anticorpo do tipo Fab 14-8 no sistema de *Pichia pastoris*, e pelo baixo rendimento obtido do Fab 14-10, foi retomada a produção dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em *E. coli* para a realização dos testes funcionais de reconhecimento da osteopontina.

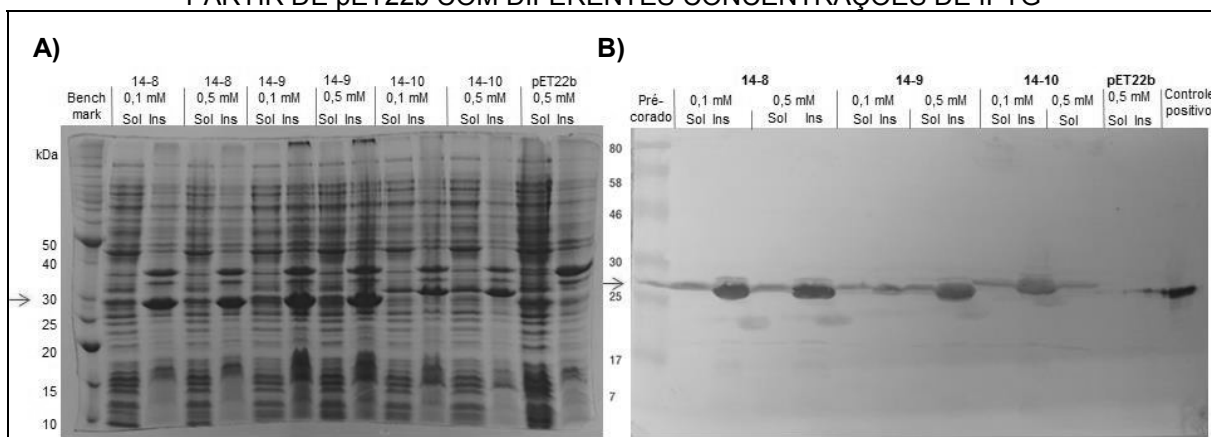
4.6 TESTES DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8, 14-9 E 14-10

4.6.1 Testes de expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em *E. coli* BL21-Star(DE3) com diferentes concentrações de IPTG

Foi realizado um teste de expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados em pET22b utilizando um inóculo de 100 mL. Foram utilizadas duas concentrações de IPTG (0,1 mM e 0,5 mM) para indução. Os extratos foram isolados e analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (FIGURA 22A) e *Western blot* (FIGURA 22B).

É possível observar uma banda em 30 kDa nas frações solúveis e insolúveis, referente à massa molecular esperada dos três fragmentos de anticorpos do tipo scFv. No entanto, não é possível concluir uma concentração ideal de IPTG para se obter um maior rendimento, visto que não há uma variação significativa entre as duas concentrações de IPTG testadas. Para os próximos ensaios de expressão foi decidido utilizar a concentração mais baixa de IPTG de 0,1 mM.

FIGURA 22 - TESTES DE INDUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv A PARTIR DE pET22b COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG

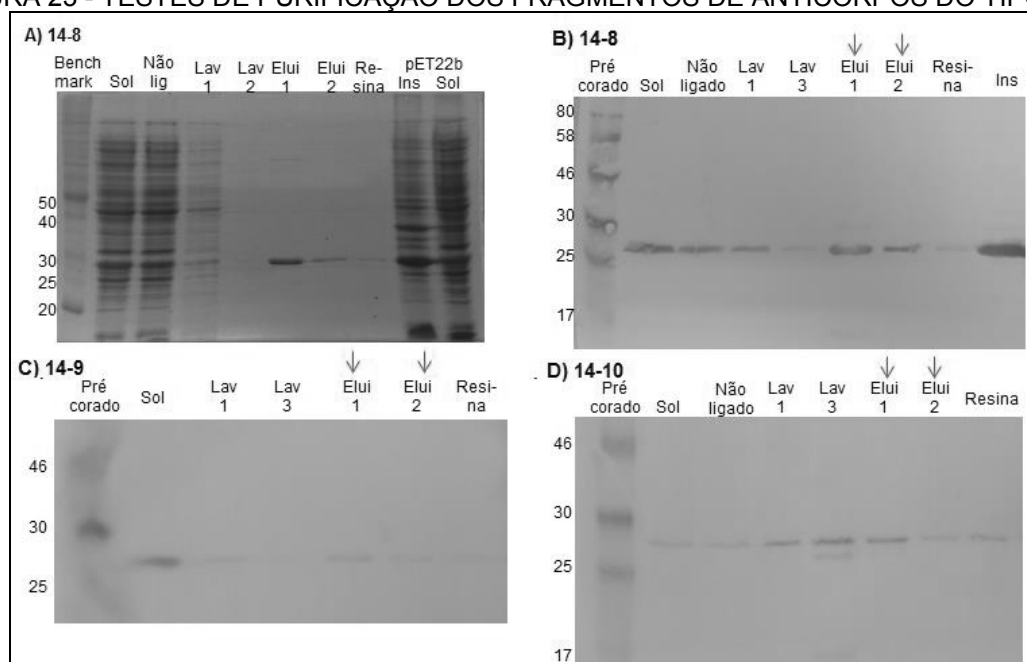


22A: Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de Coomassie para análise das frações solúveis (Sol) e insolúveis (Ins) dos anticorpos do tipo scFv, variando a concentração de IPTG (0,1 mM e 0,5 mM). *Benchmark*: Marcador *Benchmark Thermo Scientific*. 22B: *Western blot* com utilização de anticorpo anti-histidina para análise das frações solúveis e insolúveis dos anticorpos do tipo scFv, variando a concentração de IPTG (0,1 mM e 0,5 mM). Pré-corado: Marcador *Biolabs prestained protein ladder*.

Os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv foram purificados dos extratos solúveis, e o conteúdo das purificações foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot* (FIGURA 23).

É possível observar que o fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-8 (FIGURAS 23A e 23B) foi purificado em um rendimento maior que os demais fragmentos de anticorpos (FIGURAS 23C e 23D). O rendimento da purificação obtido para os fragmentos de anticorpos 14-9 e 14-10 não foi o suficiente para prosseguir com os ensaios de atividade destes fragmentos. Por isso, tornaram-se necessárias alternativas para a obtenção de um rendimento maior da produção dos anticorpos, como a tentativa de expressão em vetor de expressão pET28b.

FIGURA 23 - TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv



23A: Gel de poliácridamida 13% corado com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação do scFv 14-8. *Benchmark*: Marcador *Benchmark Thermo Scientific*. 23B, 23C e 23D: *Western blot* com utilização de anticorpo anti-histidina para análise das frações cromatográficas da purificação dos fragmentos do tipo scFv recombinantes 14-8, 14-9 e 14-10, respectivamente. Pré-corado: Marcador *Biolabs prestained protein ladder*. Legenda: Sol: fração solúvel; Não lig: não ligado a resina; Lav: lavagem; Elui: eluição; Ins: fração insolúvel

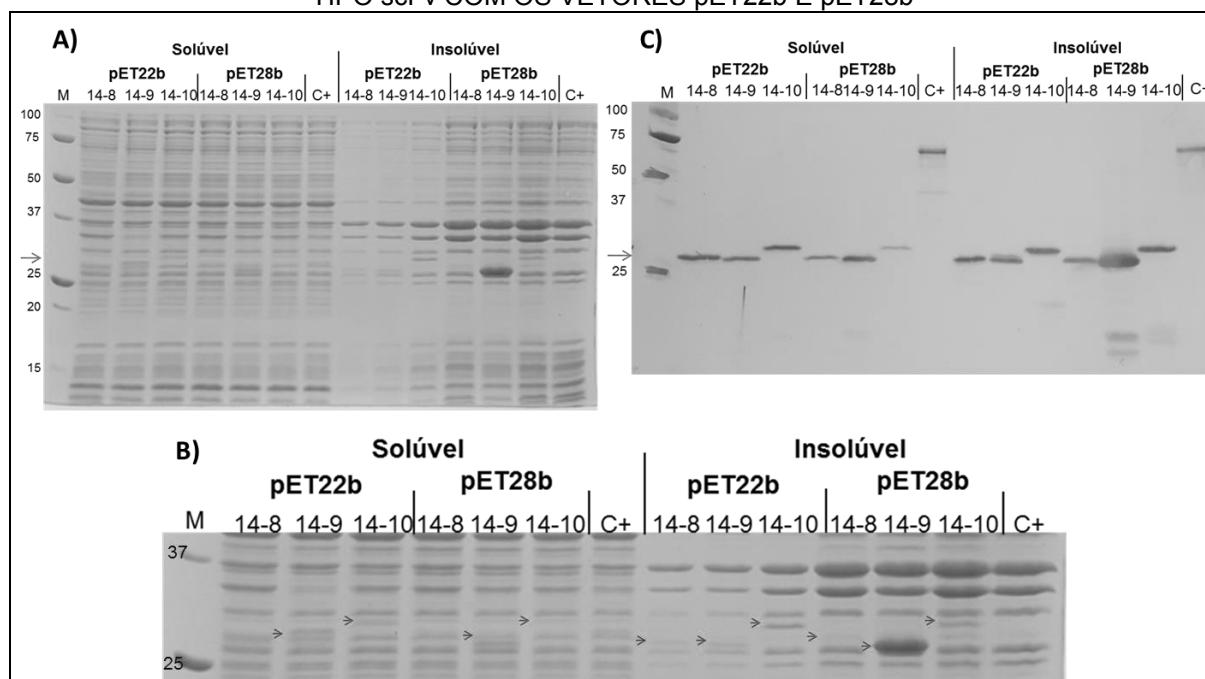
4.6.2 Comparação da expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv subclonados em pET22b e pET28b em *E. coli* BL21-Star(DE3)

Levando em consideração que as construções no vetor pET22b contém peptídeo-sinal de endereçamento para o periplasma na região N-terminal, e como esta sequência sinal é hidrofóbica, pode ser que ela esteja influenciando no rendimento da fração solúvel da proteína. Uma alternativa a esta questão foi a subclonagem dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv no vetor pET28b(+), pois

não apresenta o peptídeo sinal de endereçamento, com isso será possível comparar o rendimento da solubilidade obtido pelos dois vetores.

A partir de culturas de 50 mL de meio LB, foi realizada expressão dos fragmentos do tipo scFv subclonados em pET22b e pET28b, os quais podem ser observados em torno de 30 kDa (FIGURA 24). É possível observar que não houve uma diferença significativa entre a expressão de proteínas na fração solúvel no pET22b e no pET28b. Levando isso em consideração, foi decidido continuar utilizando o vetor pET22b para seguir com os próximos ensaios.

FIGURA 24 - ANÁLISE COMPARATIVA DE EFICIÊNCIA DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DO TIPO scFv COM OS VETORES pET22b E pET28b



24A: Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de Coomassie para análise comparativa de expressão dos fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv subclonados em pET22b e pET28b. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). 24B: Imagem maior da área do gel de poliacrilamida referente à massa molecular das proteínas. As setas indicam a presença das bandas respectivas dos anticorpos. 24C: *Western blot* com utilização de anticorpo anti-histidina para análise comparativa de expressão dos fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv subclonados em pET22b e pET28b. Controle positivo (C+): proteína L fusionada à EGFP. M: *Precision plus protein all blue standards* (Bio-Rad).

4.6.3 Purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv dos extratos solúveis e ressolubilizados a partir de corpos de inclusão

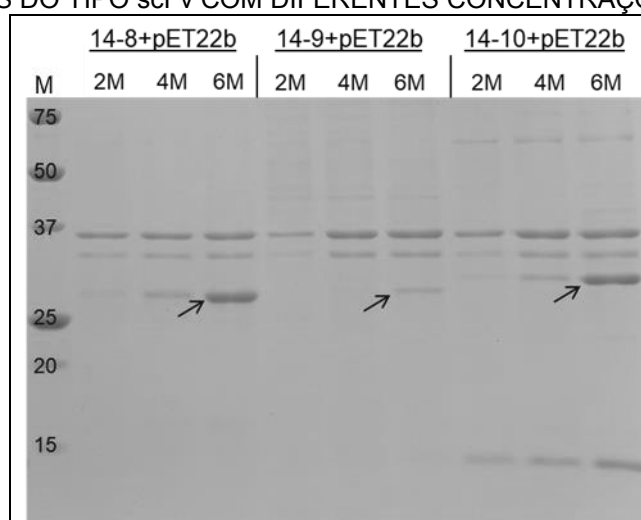
Devido aos fragmentos de anticorpos do tipo scFv estarem majoritariamente na fração insolúvel, foram realizados testes de solubilização de corpos de inclusão

com o objetivo de comparar o rendimento de proteína obtido desta fração com a fração solúvel.

Em teste preliminar para determinar a concentração necessária de ureia para solubilizar os corpos de inclusão, observou-se que um maior rendimento dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 foi obtido com a utilização de 6 M de ureia (FIGURA 25), entretanto, o scFv 14-9 não foi eficientemente solubilizado com as concentrações de ureia testadas, sendo necessárias maiores concentrações de ureia para desnaturação deste.

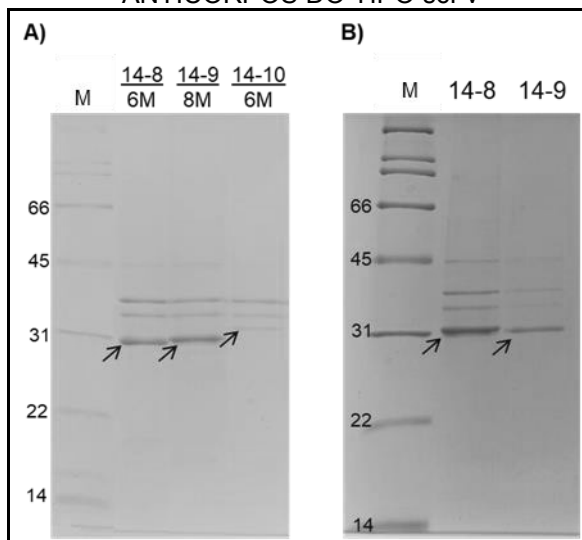
Com as concentrações determinadas de ureia para cada fragmento de anticorpo do tipo scFv, realizou-se um novo teste de expressão a partir de culturas de 200 mL, e uma nova solubilização dos extratos isolados dos fragmentos do tipo scFv 14-8 e 14-10 com 6 M de ureia, e do fragmento do tipo scFv 14-9 com 8 M de ureia (FIGURA 26A). Os fragmentos de anticorpos 14-8 e 14-9 foram obtidos em quantidades adequadas, entretanto, o fragmento de anticorpo 14-10 não foi eficientemente solubilizado com 6 M ureia, comportamento diferente ao que foi observado no teste preliminar. Devido a isto, as etapas de renaturação foram prosseguidas apenas com os fragmentos de anticorpos 14-8 e 14-9 (FIGURA 26B).

FIGURA 25 - SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UREIA



Gel de poliacrilamida 13% para análise da solubilização dos corpos de inclusão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 com 2, 4 e 6 M de ureia. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). Setas indicam a expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv.

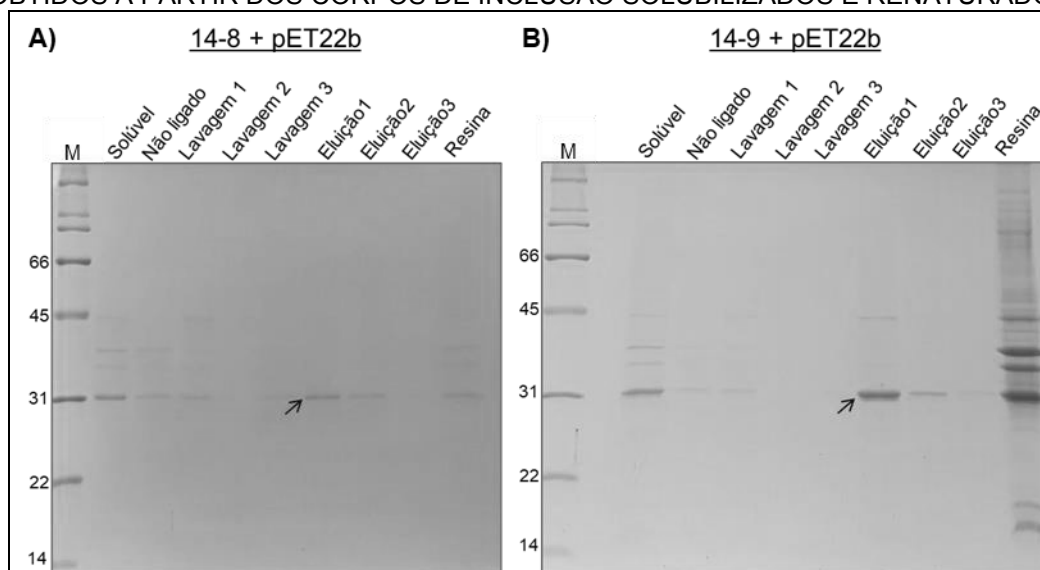
FIGURA 26 – ENSAIOS DE DESNATURAÇÃO E RENATURAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv



26A: Gel de poliácridamida 13% para análise dos corpos de inclusão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 solubilizados com 6 M, 8 M e 6 M ureia, respectivamente. 26B: Gel de poliácridamida para análise da renaturação dos corpos de inclusão dos fragmentos 14-8 e 14-9. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad). Setas indicam os fragmentos de anticorpos do tipo scFv.

Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv ressolubilizados a partir dos corpos de inclusão renaturados foram purificados parcialmente através de cromatografia de afinidade a níquel imobilizado (FIGURA 27), sendo observado um rendimento baixo para ambos.

FIGURA 27 - PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8 E 14-9 OBTIDOS A PARTIR DOS CORPOS DE INCLUSÃO SOLUBILIZADOS E RENATURADOS

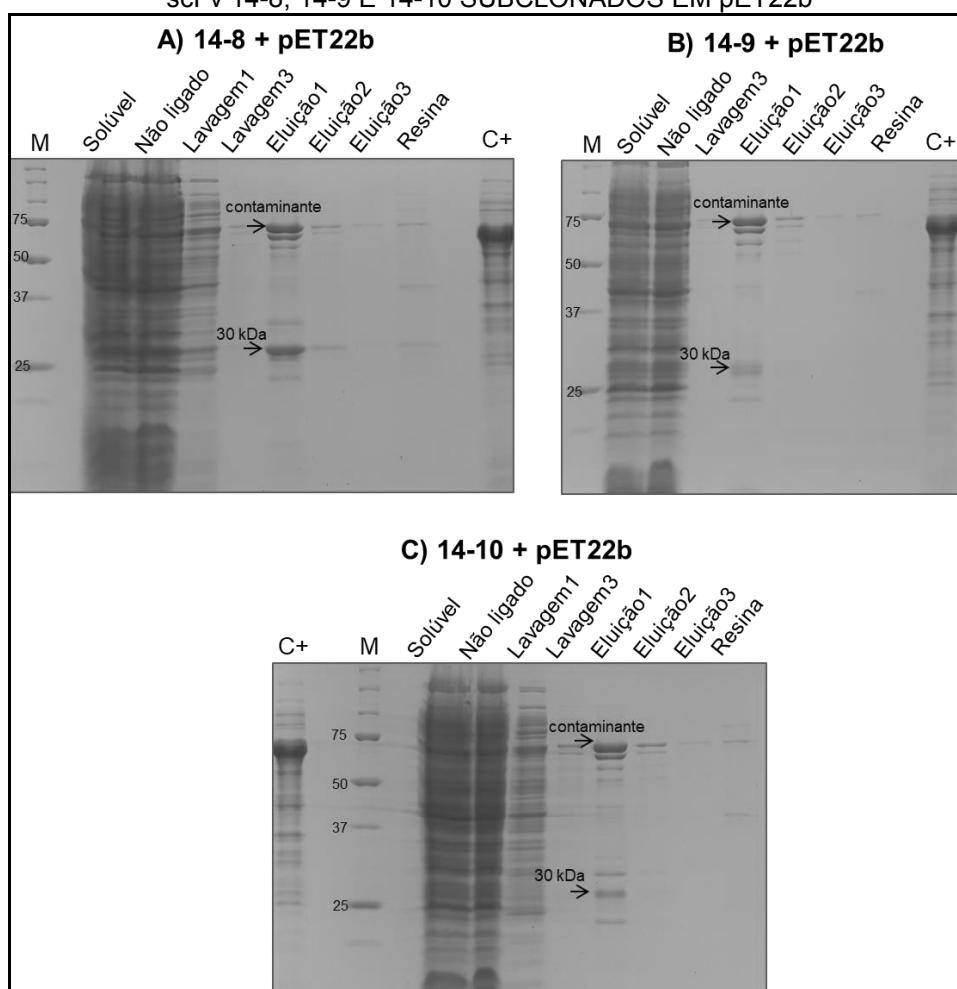


27A e 27B: Géis de poliácridamida 13% corados com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação dos fragmentos do tipo scFv 14-8 e 14-9, respectivamente, obtidos a partir dos corpos de inclusão. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad). Setas indicam os fragmentos de anticorpos do tipo scFv.

Em paralelo, os fragmentos de anticorpos do tipo scFv foram purificados parcialmente dos extratos solúveis através de cromatografia de afinidade a níquel imobilizado (FIGURA 28). Os rendimentos das purificações obtidos através da fração solúvel e dos corpos de inclusão (FIGURA 27) foram similarmente baixos, entretanto, os fragmentos purificados a partir dos corpos de inclusão apresentaram menos contaminantes que os purificados da fração solúvel, alcançando um maior grau de pureza dos anticorpos.

Apesar do baixo rendimento obtido das purificações parciais dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv dos extratos solúveis e a partir dos corpos de inclusão, as quantidades obtidas foram suficientes para realizar os ensaios iniciais de reconhecimento da osteopontina através de *Western blot*.

FIGURA 28 - TESTE DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS FRAGMENTOS DO TIPO scFv 14-8, 14-9 E 14-10 SUBCLONADOS EM pET22b



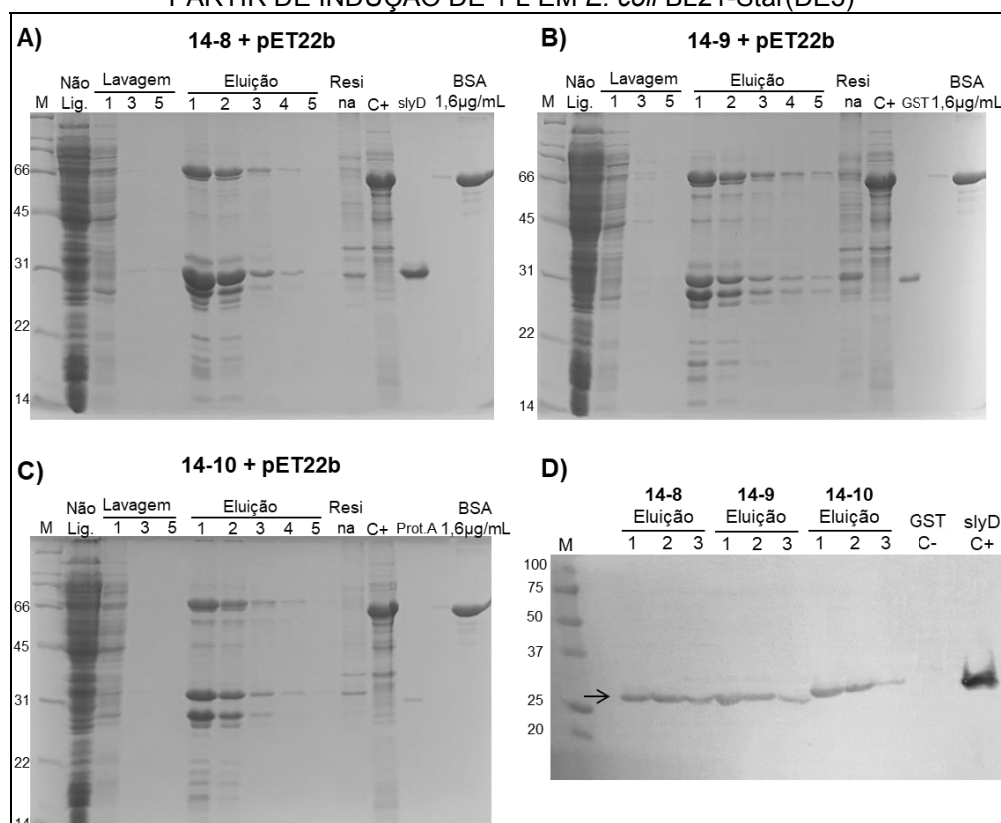
28A, 28B e 28C: Géis de poliacrilamida 13% corados com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação dos fragmentos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10, respectivamente. Controle positivo de indução (C+): proteína L fusionada à EGFP. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). Setas indicam os fragmentos de anticorpos do tipo scFv (30 kDa) e proteínas contaminantes.

4.6.4 Expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em escala de 1 L de cultura em *E. coli* BL21-Star(DE3)

Para a obtenção de uma maior quantidade dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv com a finalidade de utilizá-los em ensaios de reconhecimento da osteopontina através de termoforese em microescala, foi realizada uma indução em escala de 1 L de cultura, com subsequente purificação através de cromatografia de afinidade a metal imobilizado por utilização de coluna de gravidade. As frações da purificação foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (FIGURAS 29A, 29B e 29C) e à análise por *Western blot* (FIGURA 29D).

É possível observar que os fragmentos de anticorpos do tipo scFv foram parcialmente purificados em um bom rendimento, e suas bandas foram confirmadas através da detecção com anti-hexa-histidina em *Western blot*.

FIGURA 29 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv A PARTIR DE INDUÇÃO DE 1 L EM *E. coli* BL21-Star(DE3)



29A, 29B e 29C: Géis de poliacrilamida 13% corados com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10, respectivamente. Controle positivo de indução (C+): Proteína L fusionada à EGFP. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad). 29D: *Western blot* com utilização de anticorpo anti-histidina para análise das frações cromatográficas da purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv. M: *Precision plus protein all blue standards* (Bio-Rad). Controle positivo de *Western blot*: slyD, controle negativo de *Western blot*: GST. Seta indica os fragmentos de anticorpos.

4.6.5 Expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv em escala de 1 L de cultura em *E. coli* BL21(DE3) Δ slyD pRARE

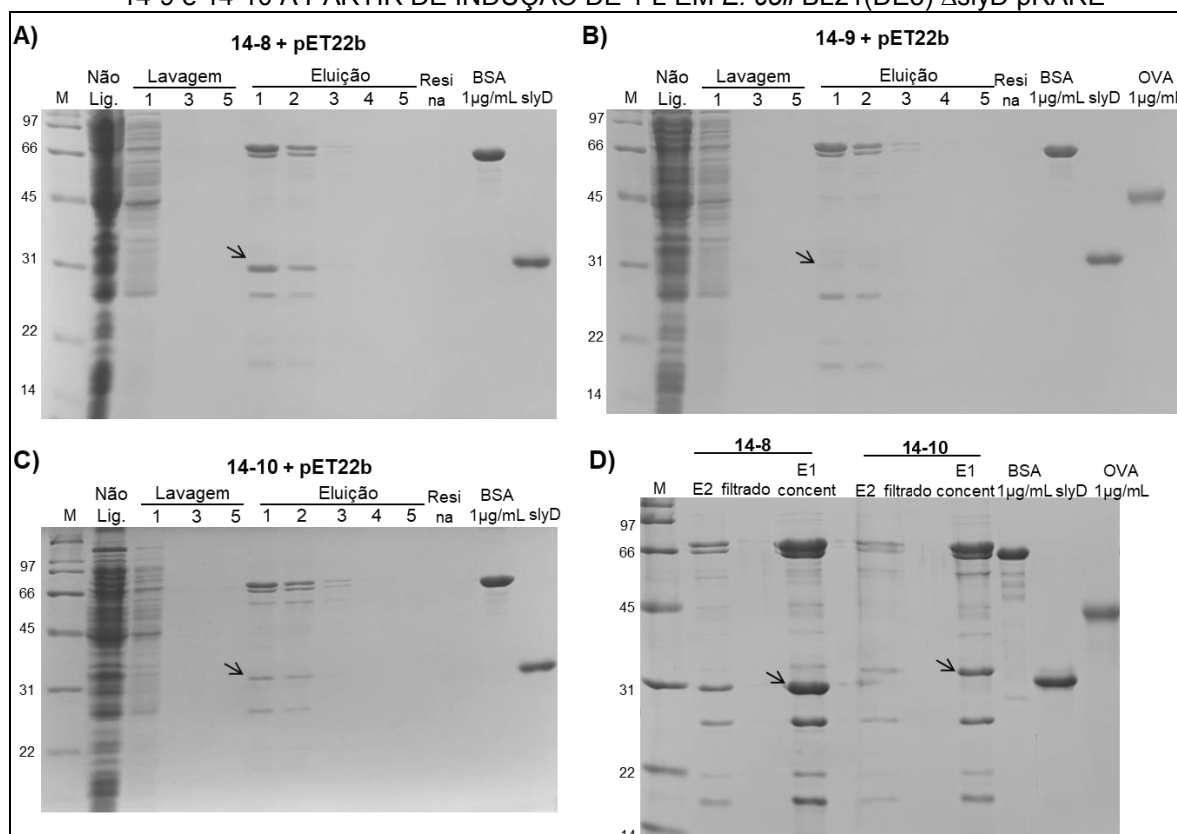
Como as bandas referentes aos fragmentos de anticorpos recombinantes se encontravam na mesma massa molecular da proteína contaminante de *E. coli* slyD (FIGURA 29), foi realizada uma nova transformação dos genes que codificam estes fragmentos de anticorpos subclonados no vetor pET22b na cepa de *E. coli* BL21(DE3) Δ slyD pRARE, a qual contém deleção do gene slyD, possibilitando assim uma análise da expressão e eventualmente melhor purificação dos fragmentos de anticorpos em comparação a utilização da cepa de *E. coli* BL21-Star(DE3), sem a deleção do gene.

Foi realizada indução em escala de 1 L de meio LB, com subsequente purificação através de cromatografia de afinidade a metal imobilizado por utilização de coluna. As frações da purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 foram submetidas à análise por eletroforese em géis de poliacrilamida (FIGURA 30A, B e C, respectivamente)

A purificação do fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-9 (FIGURA 30B) a partir da cepa *E. coli* BL21(DE3) Δ slyD pRARE resultou em um rendimento muito baixo, e portanto, não foi possível utilizar este anticorpo através da expressão a partir desta cepa nos ensaios de termoforese em microescala.

O rendimento dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 (FIGURA 30A) e 14-10 (FIGURA 30C) foi baixo, e por isso, foram concentrados para redução do volume em quatro vezes, através do uso do concentrador *Amicon ultracel* 3 kDa da Millipore (FIGURA 30D). As quantidades dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 obtidas nestas purificações parciais foram suficientes para realizar os testes iniciais de interação com a osteopontina através de termoforese em microescala, todavia, não foram suficientes para realizar os experimentos para determinação da constante de dissociação.

FIGURA 30 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8, 14-9 e 14-10 A PARTIR DE INDUÇÃO DE 1 L EM *E. coli* BL21(DE3) Δ slyD pRARE

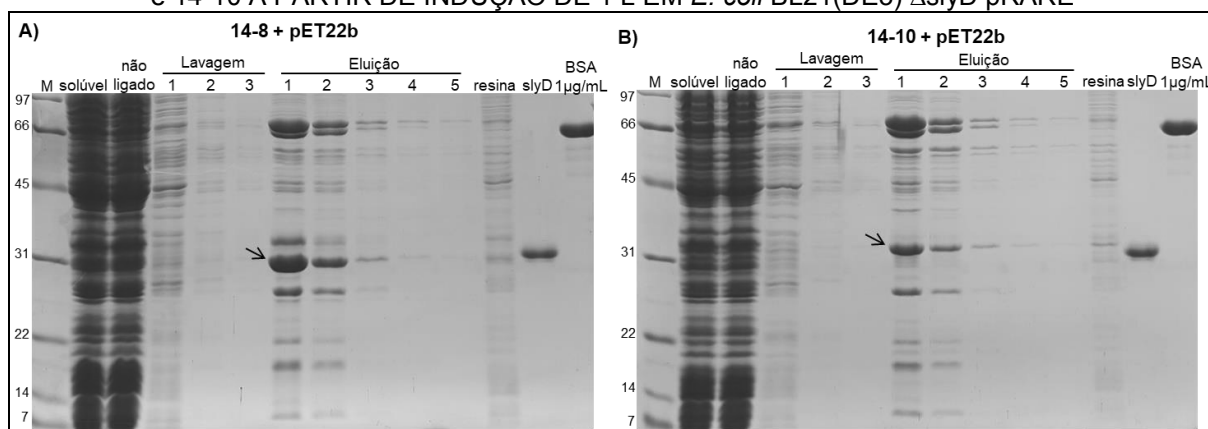


30A, 30B e 30C: Géis de poliácridamida 13% corados com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas das purificações parciais dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10, respectivamente. 30D: Gel de poliácridamida 13% para análise das amostras de eluição (E) dos fragmentos do tipo scFv 14-8 e 14-10 concentradas. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad); OVA: ovalbumina. Setas indicam os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv.

É necessário ressaltar que a purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv é apenas parcial. Considerando a falta de tempo para melhorar a purificação e visando obter mais quantidade destes fragmentos para determinar as constantes de dissociação através de termoforese em microescala, foi realizada uma nova expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10. Como o imidazol em concentração de 500 mM presente no tampão de eluição foi o suficiente para competir com o níquel da resina, realizando a eluição total dos anticorpos, espera-se que uma concentração menor ainda possibilite a eluição. Como a utilização de um tampão contendo uma menor concentração de imidazol reduziria a influência deste componente nos ensaios de termoforese em microescala, a concentração de imidazol foi alterada para 400 mM para o ensaio de purificação. As frações da purificação foram submetidas à análise através de eletroforese em géis de poliácridamida (FIGURA 31).

O rendimento desta purificação parcial obtido do fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-8 (FIGURA 31A) foi o suficiente para prosseguir com os ensaios de termoforese em microescala. Enquanto que foi necessário concentrar o fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-10 (FIGURA 31B) para redução do volume em quatro vezes, através do uso do concentrador *Amicon ultracel* 3 kDa da Millipore, para a sua utilização neste ensaio.

FIGURA 31 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv 14-8 e 14-10 A PARTIR DE INDUÇÃO DE 1 L EM *E. coli* BL21(DE3) Δ slyD pRARE



31A e 31B: Géis de poliacrilamida 13% corados com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas das purificações parciais dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10, respectivamente. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad). Setas indicam os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv.

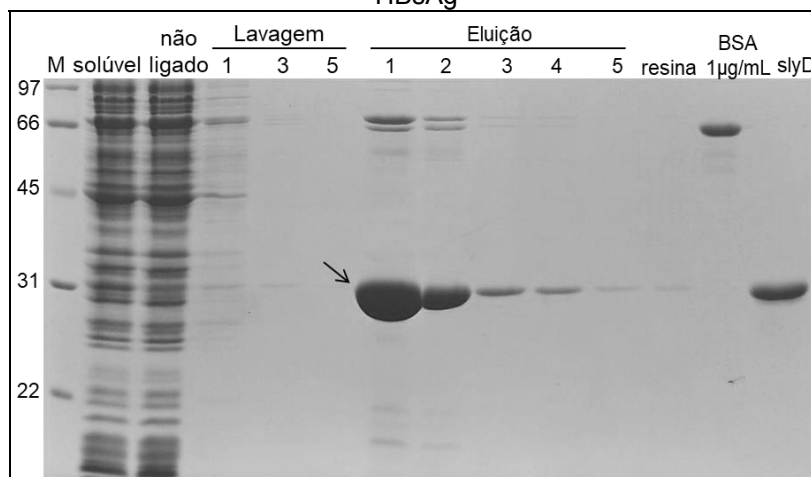
4.7 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv ANTI-HBsAg

O fragmento de anticorpo do tipo scFv anti-HBsAg foi produzido com a finalidade de ser utilizado como controle negativo nos ensaios de termoforese em microescala e dos ensaios em culturas de células.

Foi realizada indução do scFv anti-HBsAg subclonado no vetor pET22b em escala de 1 L de meio LB em *E. coli* BL21(DE3) Δ slyD pRARE. Como este anticorpo também apresenta hexa-histidina na região C-terminal, foi realizada purificação através de cromatografia de afinidade a metal imobilizado por utilização de coluna. As frações da purificação deste fragmento de anticorpo foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (FIGURA 32). O scFv anti-HBsAg foi encontrado em sua massa molecular esperada de 30 kDa, e o rendimento de sua

purificação parcial foi o suficiente para ser utilizado como controle negativo de interação nos ensaios de termoforese em microescala.

FIGURA 32– PURIFICAÇÃO PARCIAL DO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv anti-HBsAg



Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação parcial do fragmento de anticorpo do tipo scFv anti-HBsAg. Seta indica o scFv anti-HBsAg. M: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (Bio-Rad).

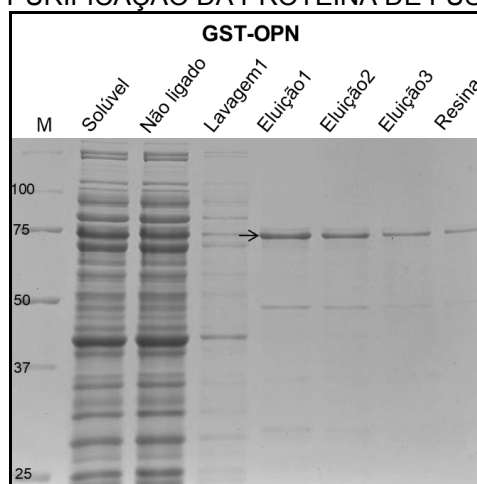
4.8 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À GST E DE GST EM *E. coli* BL21-STAR(DE3)

Para a análise da detecção da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos recombinantes através de ensaios de *Western blot*, a osteopontina fusionada à GST e o vetor vazio contendo GST (controle negativo) foram purificadas por cromatografia de afinidade através da utilização de resina de glutationa-Sepharose, e o conteúdo das frações foi analisado.

A osteopontina fusionada à GST migra com massa molecular aparente de 80 kDa (FIGURA 33). A massa molecular da osteopontina é de aproximadamente 35 kDa, e somada com a massa molecular de GST (26 kDa), a fusão apresentaria 61 kDa. Entretanto, a osteopontina apresenta uma migração aberrante em eletroforese em gel de poliacrilamida, devido a ser uma proteína intrinsecamente desestruturada, podendo ser encontrada em uma massa molecular acima da esperada, como observado por Yuan e colaboradores (2014), que também testaram sua expressão em *E. coli*, e detectaram sua migração em aproximadamente 60 kDa, uma massa molecular acima de sua teórica. Em outros testes de purificação realizados no laboratório com a osteopontina fusionada à GST, esta também foi encontrada neste

mesmo padrão de migração acima do seu teórico. Portanto, pode-se concluir que a banda presente em torno de 80 kDa observada na figura 33 é referente à esta proteína. O rendimento de purificação obtido desta proteína foi o suficiente para prosseguir com os ensaios para analisar se os fragmentos de anticorpos recombinantes conseguem reconhecê-la.

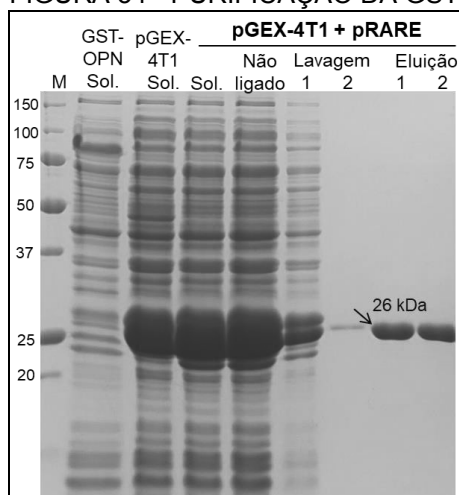
FIGURA 33 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO GST-OPN



Gel de poliacrilamida 10% corado com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação da osteopontina fusionada à GST (GST-OPN). M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). Seta indica a proteína de fusão GST-OPN em sua massa molecular aparente de 80 kDa.

É possível observar que a purificação da GST também foi eficaz, sendo encontrada em sua massa molecular esperada de 26 kDa (FIGURA 34).

FIGURA 34 - PURIFICAÇÃO DA GST



Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação do vetor pGEX-4T1 (GST). Sol: fração solúvel. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). Seta indica a proteína GST em sua massa molecular de aproximadamente 26 kDa.

4.9 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À EGFP EM *E. coli* BL21-STAR(DE3)

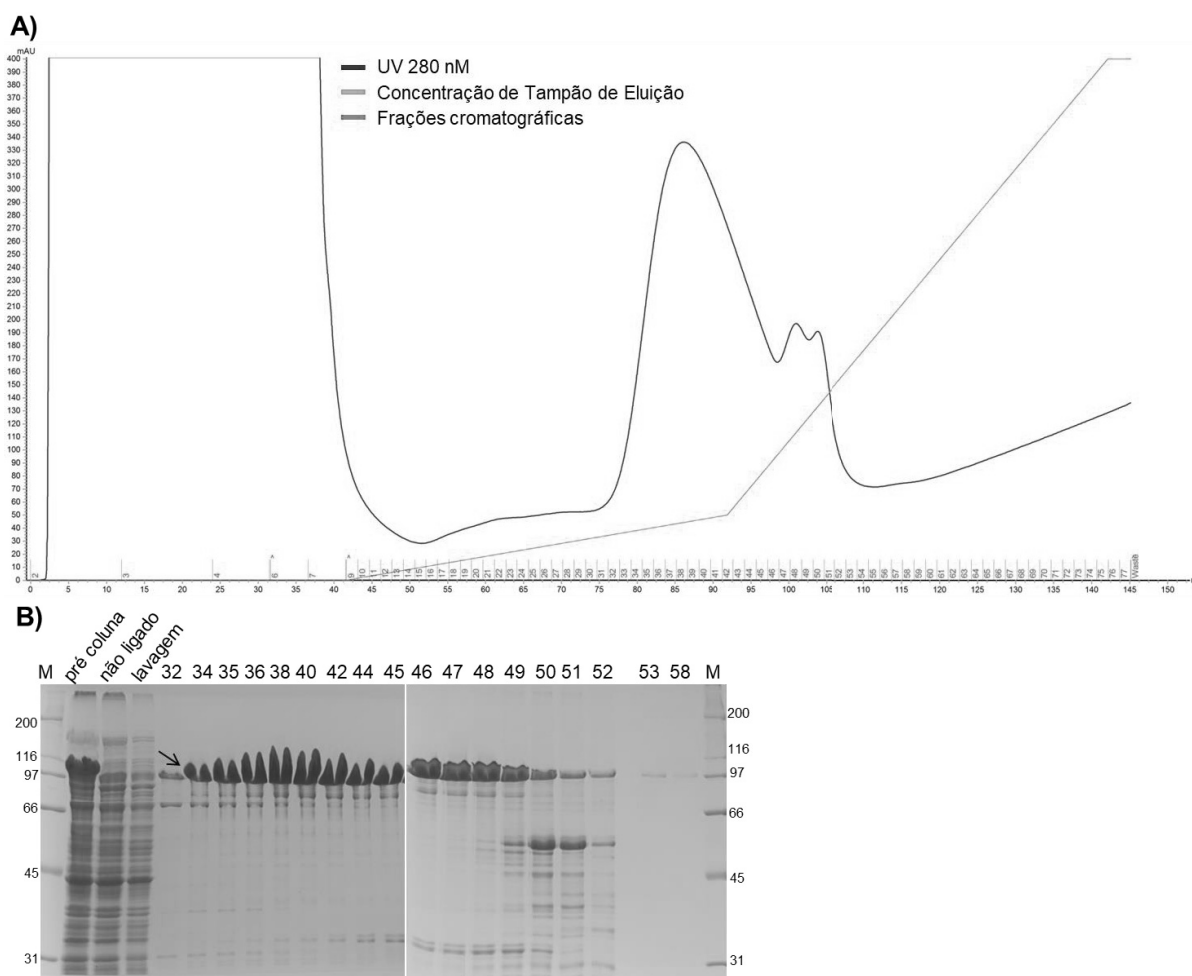
O clone da osteopontina fusionada à EGFP no vetor pET28a-TEV foi construído com a finalidade de ser utilizado em citometria de fluxo a fim de verificar se consegue interagir com os receptores da superfície celular. Através deste experimento é possível testar se os fragmentos de anticorpos podem inibir a ligação da osteopontina a estes receptores. A fusão da osteopontina à EGFP também foi utilizada nos ensaios de termoforese em microescala a fim de avaliar a interação entre os fragmentos de anticorpos e essa proteína.

Após confirmação de inserção correta dos genes que codificam a EGFP e a osteopontina no vetor pET28a-TEV através de análise por digestão com enzimas de restrição, foram realizados ensaios de expressão e purificação dessa proteína.

A partir de 1 L de cultura, a osteopontina fusionada à EGFP foi purificada do extrato solúvel através da utilização de coluna His Trap HP 5 mL, e o conteúdo das frações cromatográficas obtidas foi analisado por eletroforese (FIGURA 35). A banda referente à osteopontina fusionada à EGFP foi observada em uma massa molecular de aproximadamente 95 kDa, migrando acima do esperado de 63 kDa e apresentando o mesmo comportamento observado para a fusão GST-OPN. Como discutido anteriormente, a osteopontina apresenta um padrão de migração aberrante em eletroforese em gel de poliacrilamida, e, portanto, pode-se concluir que a proteína que migra com aproximadamente 95 kDa é correspondente à osteopontina fusionada à EGFP.

A quantidade obtida de osteopontina fusionada à EGFP foi o suficiente para a realização dos ensaios de termoforese em microescala e para os ensaios de sua ligação aos receptores celulares.

FIGURA 35 – PURIFICAÇÃO DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À EGFP



35A: Cromatograma resultante da purificação da osteopontina fusionada à EGFP, demonstrando a absorbância UV 280 nm, concentração do tampão de eluição e frações cromatográficas em relação ao volume de tampões utilizados. 35B: Gel de poliácridamida 10% corado com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação da osteopontina fusionada à EGFP. Seta indica a osteopontina fusionada à EGFP. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad).

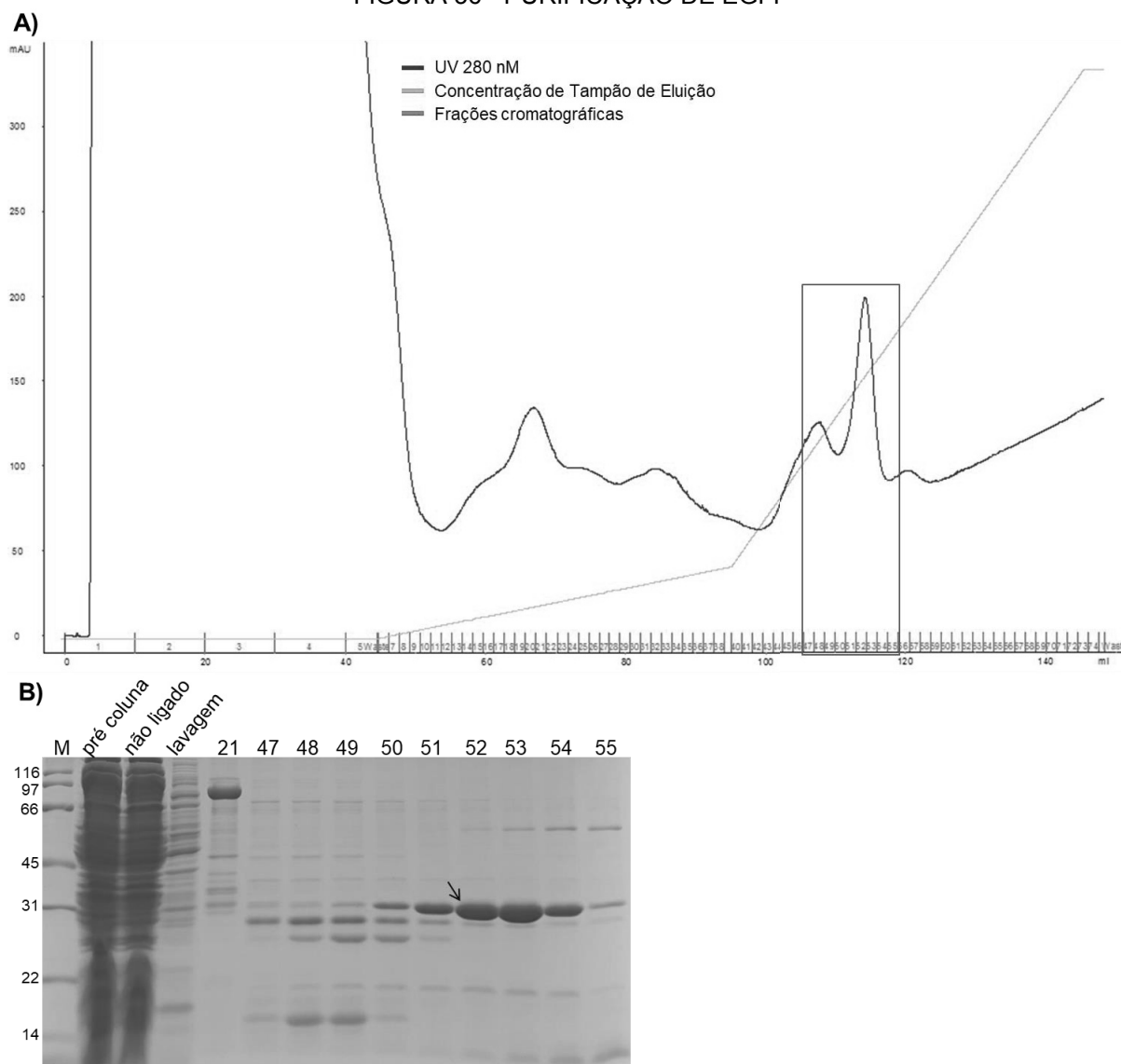
4.10 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE EGFP EM *E. coli* BL21-STAR(DE3)

A purificação da proteína EGFP foi realizada com a finalidade de esta ser utilizada como controle negativo nos experimentos de interação dos anticorpos nos ensaios de termoforese em microescala e de ligação da osteopontina aos receptores celulares.

A partir de 1 L de cultura, a proteína EGFP foi purificada do extrato solúvel através da coluna His Trap HP 5 mL, e o conteúdo das frações cromatográficas obtidas foi analisado por eletroforese (FIGURA 36). A EGFP migrou no gel de poliácridamida com a massa molecular esperada de aproximadamente 29,5 kDa. O

rendimento obtido das frações 52 e 53 foi o suficiente para a EGFP ser utilizada como controle negativo nos ensaios de termoforese em microescala e em cultura de células.

FIGURA 36 - PURIFICAÇÃO DE EGFP



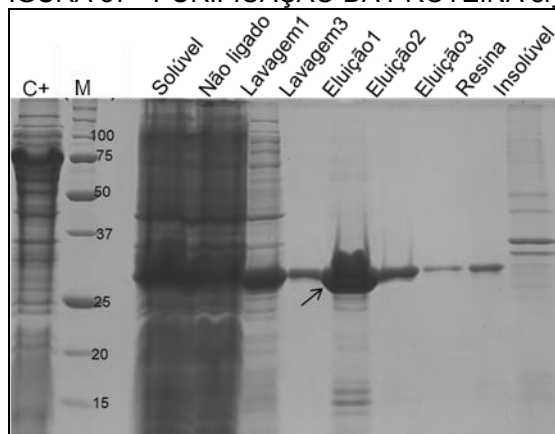
36A: Cromatograma resultante da purificação de EGFP, demonstrando a absorbância UV 280 nm, concentração do tampão de eluição e frações cromatográficas em relação ao volume de tampões utilizados, destacando-se as amostras referentes ao pico utilizadas para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida. 36B: Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação de EGFP. Seta indica a proteína EGFP. M: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (Bio-Rad).

4.11 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE slyD EM *E. coli* BL21-STAR(DE3)

Devido à proteína slyD apresentar hexa-histidina, ela foi purificada com a finalidade de ser utilizada como controle positivo para o anticorpo anti-histidina nos

ensaios de reconhecimento da osteopontina pelos fragmentos de anticorpos em *Western blot*. A proteína slyD migrou em sua massa molecular esperada de 30 kDa (FIGURA 37).

FIGURA 37 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA slyD



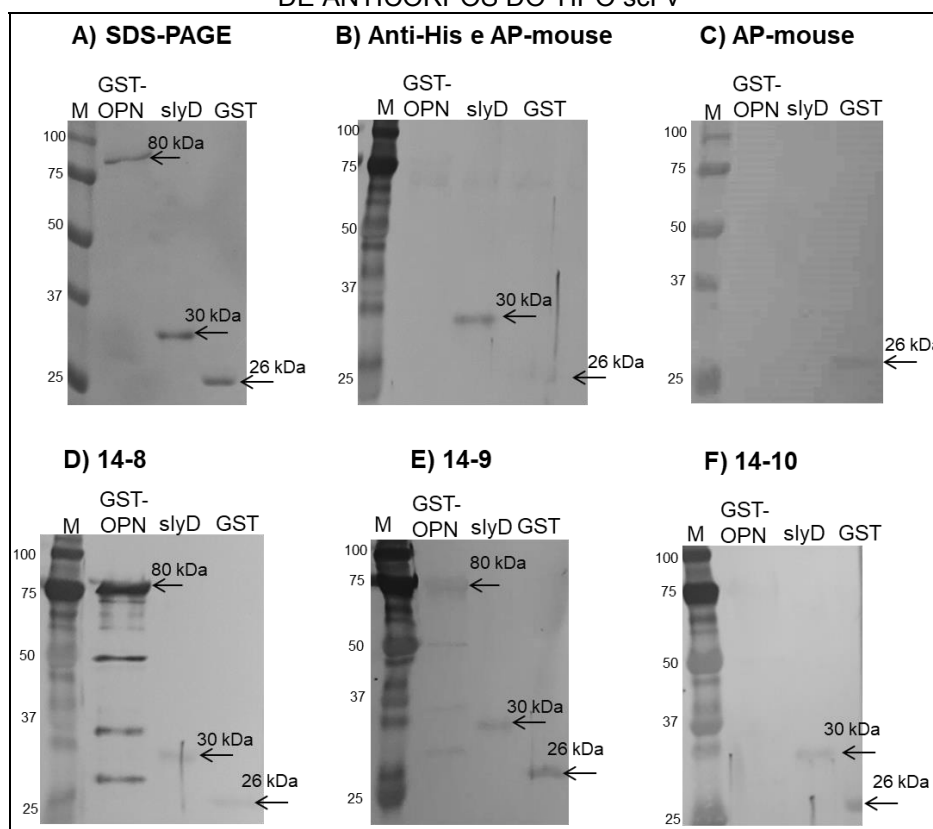
Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de Coomassie para análise das frações cromatográficas da purificação da proteína slyD. Controle positivo de indução (C+): proteína L fusionada à EGFP. Seta indica a proteína slyD. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad).

4.12 ENSAIOS DE ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv ATRAVÉS DE *WESTERN BLOT*

Em ensaio preliminar realizado por *Western blot* para analisar a atividade dos anticorpos (FIGURA 38), foi possível observar que o fragmento de anticorpo 14-8 reconheceu a osteopontina, pela presença da banda de 80 kDa (FIGURA 38D). A presença de outras bandas é proveniente de produtos de degradação da proteína de fusão GST-OPN. É possível observar uma banda muito fraca referente a detecção da osteopontina pelo fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-9 (FIGURA 38E) e não é possível observar a detecção pelo fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-10 (FIGURA 38F). A proteína slyD utilizada como controle positivo foi detectada nos ensaios, fornecendo o resultado esperado. Entretanto, também foi possível visualizar a presença do controle negativo GST em todos os ensaios, e por isso, visando confirmar se houve algum problema com os reagentes utilizados, foram realizados testes controles, através da incubação apenas com os anticorpos anti-histidina e anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (AP-mouse), e da incubação apenas com o anticorpo AP-mouse, ambos sem a incubação com os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv (FIGURAS 38 B e C, respectivamente). Como

o controle negativo também foi detectado nos testes controles, e já que a osteopontina não foi detectada nestes testes e também não foi quando incubada com o fragmento 14-10 (FIGURA 38F), este resultado pode ser interpretado como sendo um problema em algum reagente utilizado para a técnica, e não que a GST seja detectada pelos fragmentos de anticorpos do tipo scFv.

FIGURA 38 - ENSAIOS DE *WESTERN BLOT* PARA VERIFICAR ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv



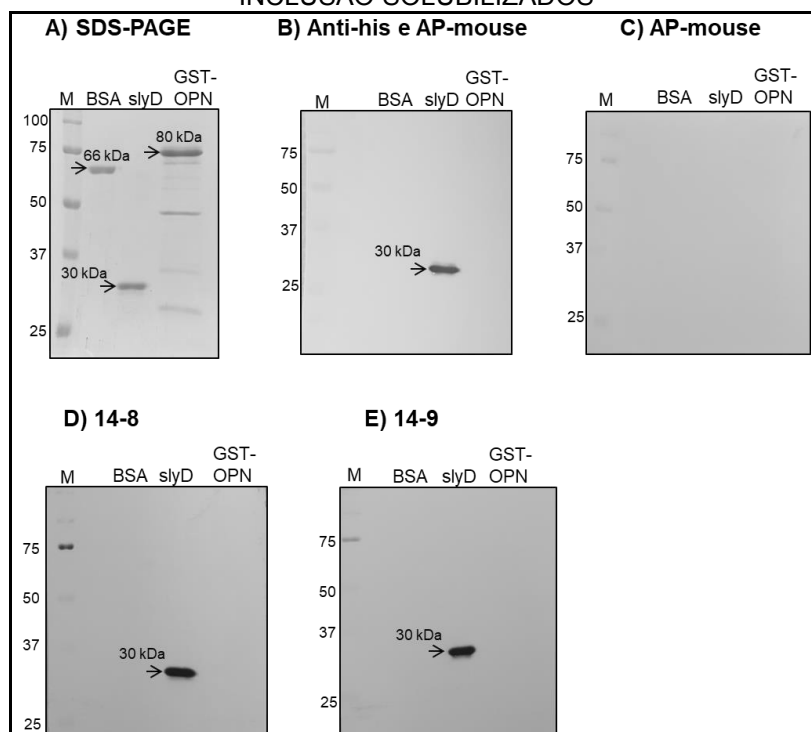
38A: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 13% contendo as mesmas quantidades de amostras aplicadas em relação ao gel submetido à transferência para membrana de *Western blot*. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). 38B: Ensaio controle: incubações somente com anticorpos anti-histidina (anti-his) e anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (AP-mouse). 38C: Ensaio controle: incubação apenas com AP-mouse. 38D, 38E e 38F: Incubações com fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10, respectivamente. M: *Precision plus protein all blue standards* (Bio-Rad).

Novos ensaios de *Western blot* foram realizados com os fragmentos de anticorpos recombinantes parcialmente purificados a partir do extrato solúvel e dos corpos de inclusão solubilizados. Como foi possível purificar apenas os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-9 a partir de corpos de inclusão solubilizados, o ensaio de *Western blot* com a utilização do fragmento de anticorpo do tipo 14-10 foi realizado apenas com a sua purificação dos extratos solúveis.

Para o ensaio com os fragmentos de anticorpos do tipo scFv renaturados a partir de corpos de inclusão, a osteopontina fusionada à GST, o controle positivo de *Western blot* slyD contendo hexa-histidina, e o controle negativo BSA foram submetidos em eletroforese em gel de poliacrilamida, e transferidos em membrana PVDF.

Os dois ensaios controles negativos (Anti-his + AP-mouse e AP-mouse) sem a incubação com os fragmentos de anticorpos do tipo scFv parcialmente purificados a partir de corpos de inclusão forneceram os resultados esperados (FIGURAS 39B e C). Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv parcialmente purificados a partir de corpos de inclusão solubilizados não conseguiram detectar a osteopontina (FIGURAS 39D e E). Isso pode ser devido ao fato de que os fragmentos de anticorpos recombinantes foram submetidos a tratamentos de ensaios de desnaturação e renaturação, e em resposta a estes tratamentos, eles não terem sido enovelados corretamente, não mantendo a sua forma funcional.

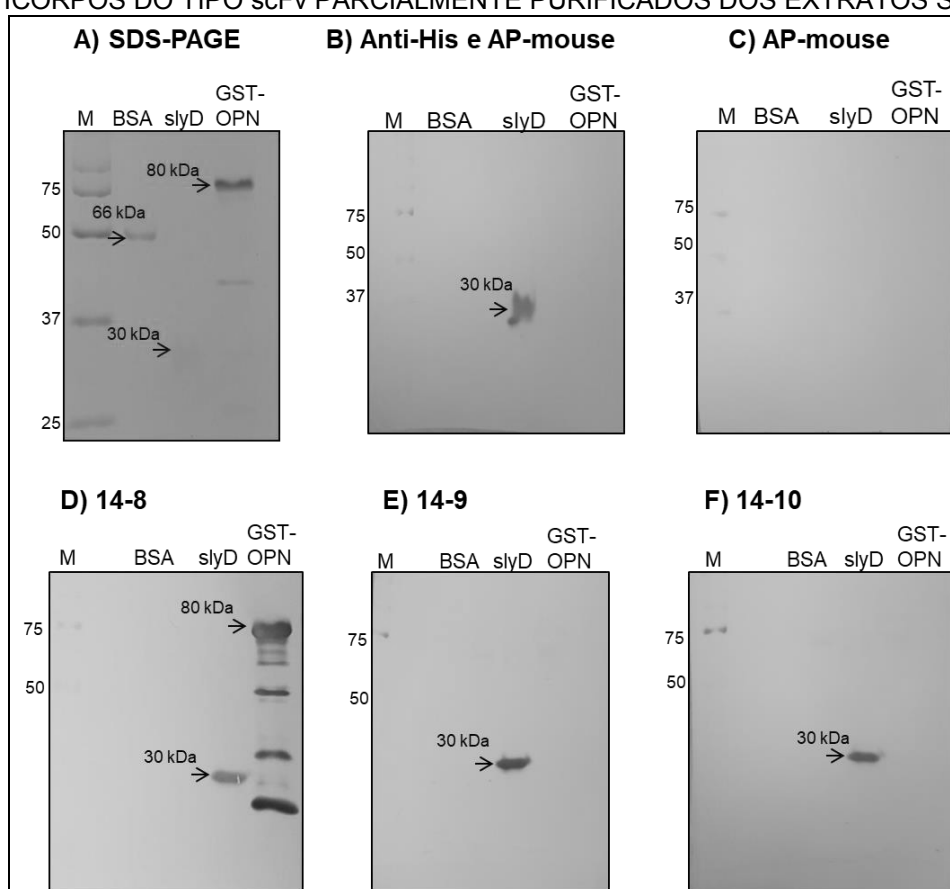
FIGURA 39 - ENSAIOS DE *WESTERN BLOT* PARA VERIFICAR ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv PARCIALMENTE PURIFICADOS A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO SOLUBILIZADOS



39A: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 13% contendo as mesmas quantidades de amostras aplicadas em relação ao gel submetido à transferência para membrana de *Western blot*. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). 39B: Ensaio controle: incubações somente com anticorpos anti-histidina (anti-his) e anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (AP-mouse). 39C: Ensaio controle: incubação apenas com anticorpo AP-mouse. 39D e 39E: Incubações com fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-9, respectivamente, parcialmente purificados a partir de corpos de inclusão solubilizados. M: *Precision plus protein all blue standards* (Bio-Rad).

No ensaio com a incubação com os fragmentos de anticorpos do tipo scFv parcialmente purificados dos extratos solúveis, o fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-8 conseguiu reconhecer a osteopontina, pela presença da banda de 80 kDa (FIGURA 40D). Já os fragmentos 14-9 e 14-10 não conseguiram detectar esta proteína (FIGURAS 40E e F, respectivamente). Os dois ensaios controles (Anti-His + AP-mouse e AP-mouse) sem a incubação com os fragmentos de anticorpos forneceram os resultados esperados (FIGURAS 40B e C).

FIGURA 40 - ENSAIOS DE *WESTERN BLOT* PARA VERIFICAR ATIVIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv PARCIALMENTE PURIFICADOS DOS EXTRATOS SOLÚVEIS



40A: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 13% contendo as mesmas quantidades de amostras aplicadas em relação ao gel submetido à transferência para membrana de *Western blot*. M: *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad). 40B: Ensaio controle: incubações somente com anticorpos anti-histidina (anti-his) e anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (AP-mouse). 40C: Ensaio controle: incubação apenas com anticorpo AP-mouse. 40D, 40E e 40F: Incubações com fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10, respectivamente, parcialmente purificados dos extratos solúveis. M: *Precision plus protein all blue standards* (Bio-Rad).

Com esses resultados, conclui-se que apenas o fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-8 purificado do extrato solúvel consegue detectar a osteopontina em ensaios de detecção por *Western blot*.

Como os ensaios de *Western blot* realizados dependem da utilização de três incubações com anticorpos diferentes, não é uma técnica muito sensível, e, portanto, este ensaio pode dificultar a avaliação da atividade dos anticorpos, e não fornecer um resultado preciso. Devido a isso, uma alternativa foi a realização do ensaio de termoforese em microescala para análise da interação entre essas moléculas, sendo este um método muito mais sensível, e que pode fornecer resultados de forma qualitativa e quantitativa.

4.13 ENSAIO DE INTERAÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv E DA OSTEOPONTINA FUSIONADA À EGFP ATRAVÉS DE TERMOFORESE EM MICROESCALA

4.13.1 Análise da interação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 com a osteopontina

Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv purificados a partir de uma indução de 1 L estavam em tampão de eluição Tris HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% e 500 mM de imidazol, enquanto que a osteopontina fusionada à EGFP foi submetidas a diálise, sendo constituídas em uma solução final de tampão fosfato-salino, composto de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na_2HPO_4 e 1,5 mM de KH_2PO_4 (PBS).

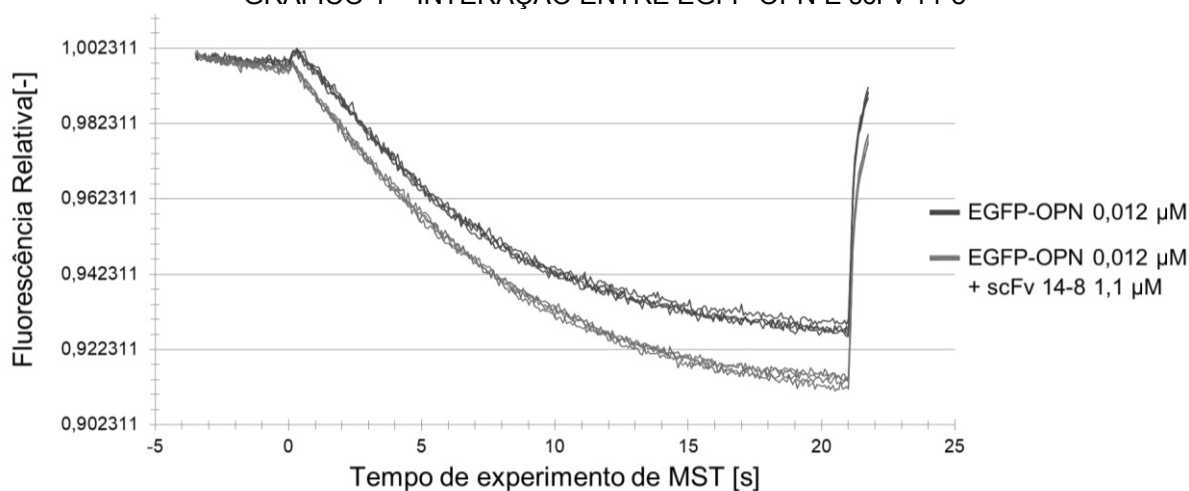
Os fragmentos de anticorpos foram diluídos três vezes, para serem utilizados nos ensaios na concentração definida de 1,1 μM . Foi realizado um pré-teste com a osteopontina fusionada à EGFP para verificar se ela era compatível com o tampão de eluição diluído três vezes, e foi confirmada ausência de agregação entre as moléculas aos componentes desta solução.

A interação entre 12 nM de osteopontina fusionada à EGFP e 1,1 μM dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 foi analisada, e as curvas geradas avaliadas. Também foi realizado um experimento controle utilizando 1,1 μM de ovalbumina e 12 nM de osteopontina fusionada à EGFP.

A curva gerada é resultante da fluorescência emitida dos quatro capilares contendo apenas a proteína alvo, e quatro capilares contendo a proteína alvo com adição dos ligantes (scFv) ou do controle (ovalbumina).

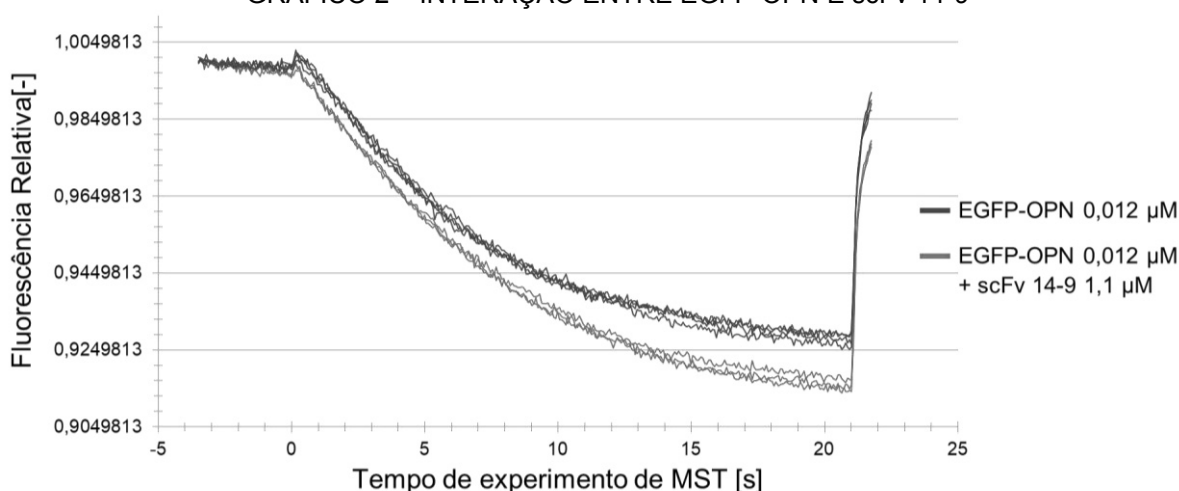
Observa-se que as interações da osteopontina com os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 (GRÁFICO 1), 14-9 (GRÁFICO 2) e 14-10 (GRÁFICO 3) geraram uma curva diferente em relação a curva da proteína sem a adição de ligantes, indicando que os fragmentos de anticorpos do tipo scFv conseguem interagir com essa proteína. No experimento com a proteína ovalbumina, a qual não deve interagir com a osteopontina, a curva gerada pela osteopontina sem o ligante e com o ligante permanece a mesma (GRÁFICO 4), indicando que não houve interação.

GRÁFICO 1 – INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv 14-8



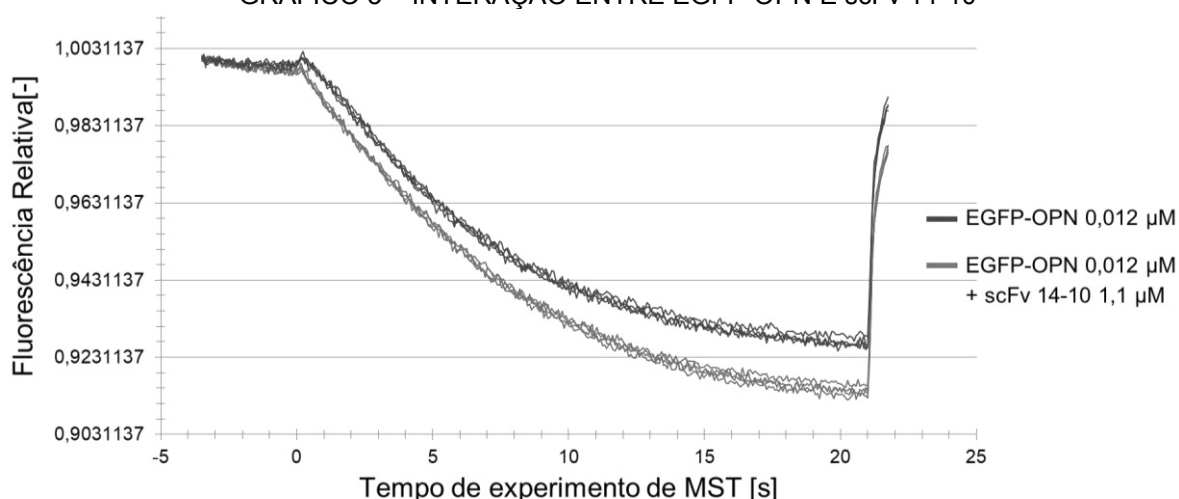
Curvas geradas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento de MST. Curvas referentes à fluorescência emitida por quatro amostras contendo 0,012 µM de osteopontina fusionada à EGFP em azul, e por quatro amostras contendo 0,012 µM de osteopontina fusionada à EGFP com adição de 1,1 µM de fragmento do tipo scFv 14-8 em verde.

GRÁFICO 2 – INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv 14-9



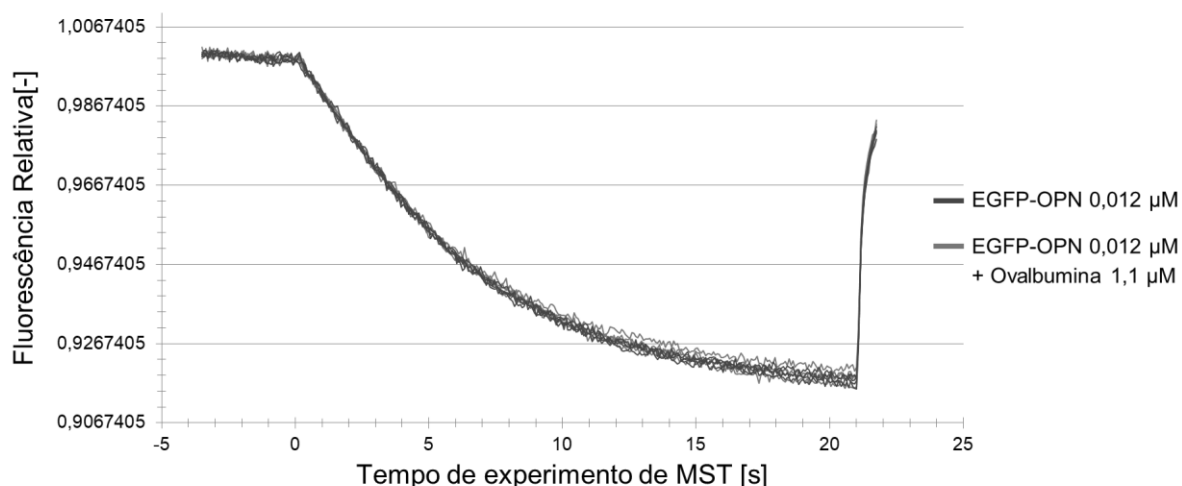
Curvas geradas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento de MST. Curvas referentes à fluorescência emitida por quatro amostras contendo 0,012 µM de osteopontina fusionada à EGFP em azul, e por três amostras contendo 0,012 µM de osteopontina fusionada à EGFP com adição de 1,1 µM de fragmento do tipo scFv 14-9 em verde.

GRÁFICO 3 – INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv 14-10



Curvas geradas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento de MST. Curvas referentes à fluorescência emitida por quatro amostras contendo 0,012 μM de osteopontina fusionada à EGFP em azul, e por quatro amostras contendo 0,012 μM de osteopontina fusionada à EGFP com adição de 1,1 μM de fragmento do tipo scFv 14-10 em verde.

GRÁFICO 4 – EXPERIMENTO CONTROLE COM EGFP-OPN E OVALBUMINA



Curvas geradas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento de MST. Curvas referentes à fluorescência emitida por quatro amostras contendo 0,012 μM de osteopontina fusionada à EGFP em azul, e por quatro amostras contendo 0,012 μM de osteopontina fusionada à EGFP com adição de 1,1 μM do controle ovalbumina em verde.

As curvas geradas em relação à interação dos anticorpos com a osteopontina emitiram um sinal de fluorescência menor do que a curva apenas da osteopontina, divergindo da curva padrão esperada de aumento da intensidade de fluorescência. Essa redução de sinal ocorre devido ao fluxo de moléculas se direcionar para longe do ponto de calor, fenômeno chamado de termoforese positiva (VAN DEN BOGAART et al., 2011). A termoforese positiva pode ocorrer devido ao ligante se associar à proteína em um local próximo do marcador de fluorescência, ou também

pela ocorrência de alterações conformacionais na proteína durante a ligação (SEIDEL, 2014).

Moon e colaboradores (2008) testaram a interação de aptâmeros de RNA com o metabólito bacteriano *pre-queosine1* através de termoforese em microescala. O aptâmero de RNA do organismo modelo *B. subtilis* exibiu uma curva de termoforese positiva ao interagir com o metabólito *pre-queosine1*. Como os aptâmeros de RNA são conhecidos por apresentarem mudanças conformacionais após ligação a um metabólito, é possível concluir que a mudança conformacional do complexo foi responsável pela redução do sinal de fluorescência após a ligação, e, portanto, responsável pela termoforese positiva.

Com esses dados, é possível concluir que os três fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10 interagiram com a osteopontina, e que esta ligação pode ter desencadeado mudanças conformacionais na proteína, resultando numa menor intensidade de sinal de fluorescência em comparação a intensidade da proteína sem ligante.

No ensaio de *Western blot* foi possível observar o reconhecimento da osteopontina apenas pelo scFv 14-8, enquanto que no ensaio de termoforese em microescala foi possível verificar a detecção da osteopontina pelos fragmentos do tipo scFv 14-8, 14-9 e 14-10. Como a termoforese em microescala é uma técnica que necessita de pouca quantidade de amostra, e sendo mais sensível que os ensaios de *Western blot*, que dependem de três incubações de anticorpos diferentes e podem dificultar o teste, é possível concluir que os resultados gerados pela termoforese em microescala são mais confiáveis.

4.13.2 Análise da constante de dissociação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 com a osteopontina fusionada à EGFP

Devido ao baixo rendimento do fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-9 purificado, os ensaios de termoforese em microescala não foram prosseguidos com este anticorpo.

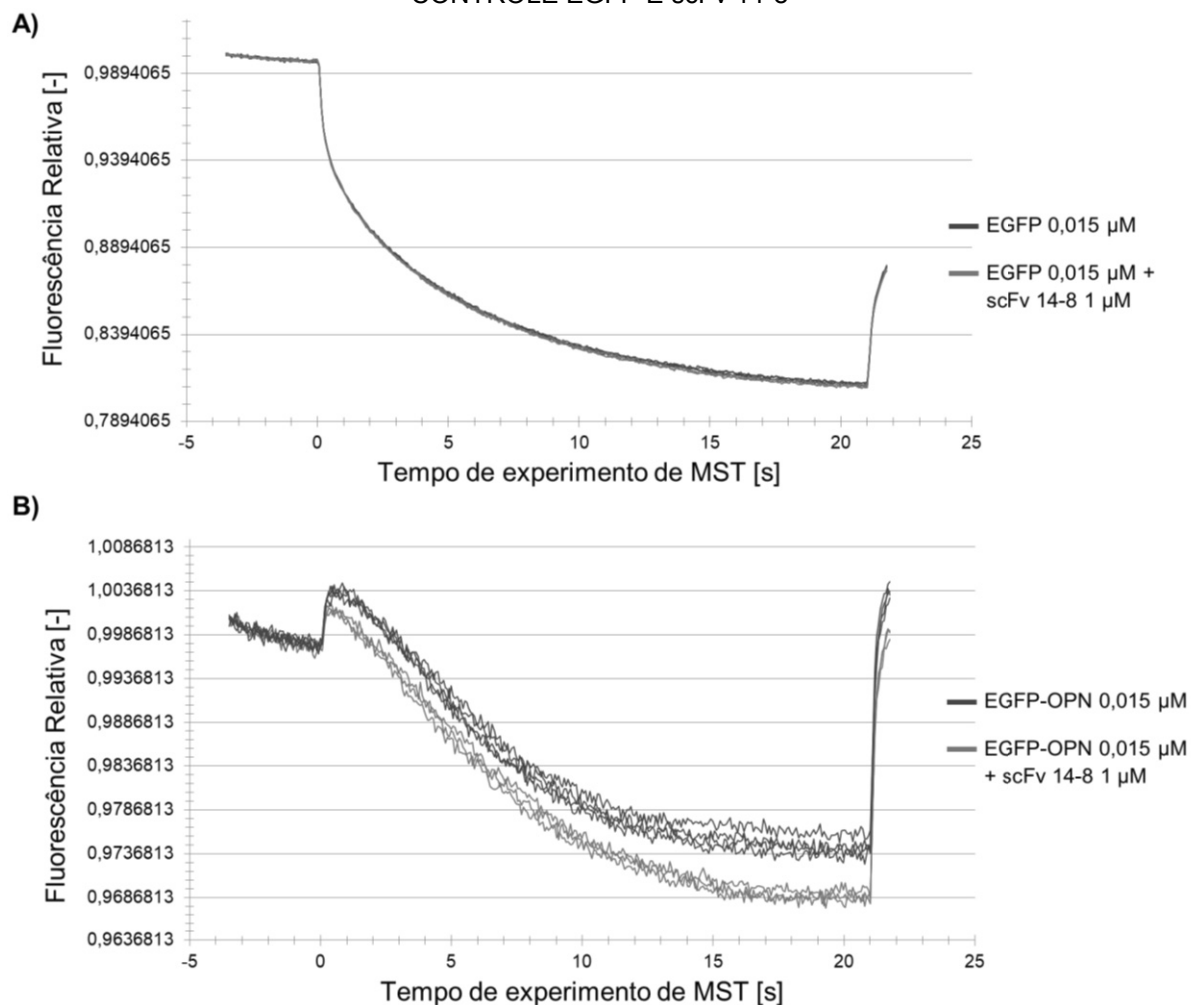
Foram realizados novos ensaios de interação entre os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 e a EGFP-OPN e o controle EGFP, com a finalidade de confirmar suas interações para posteriormente avaliar a constante de

dissociação de cada anticorpo. A constante de dissociação se refere à concentração do ligante necessária para que metade da proteína-alvo esteja associada a ele.

Para este teste, os fragmentos de anticorpos foram diluídos 7,5 vezes, para serem utilizados na concentração definida de 1 μ M. Foram realizados pré-testes com 15 nM de osteopontina fusionada à EGFP e com 15 nM de EGFP para verificar se estas proteínas são compatíveis com o tampão de eluição diluído, e após confirmação da ausência de agregação entre as moléculas aos componentes deste tampão, foram realizados os ensaios de interação e as curvas geradas avaliadas.

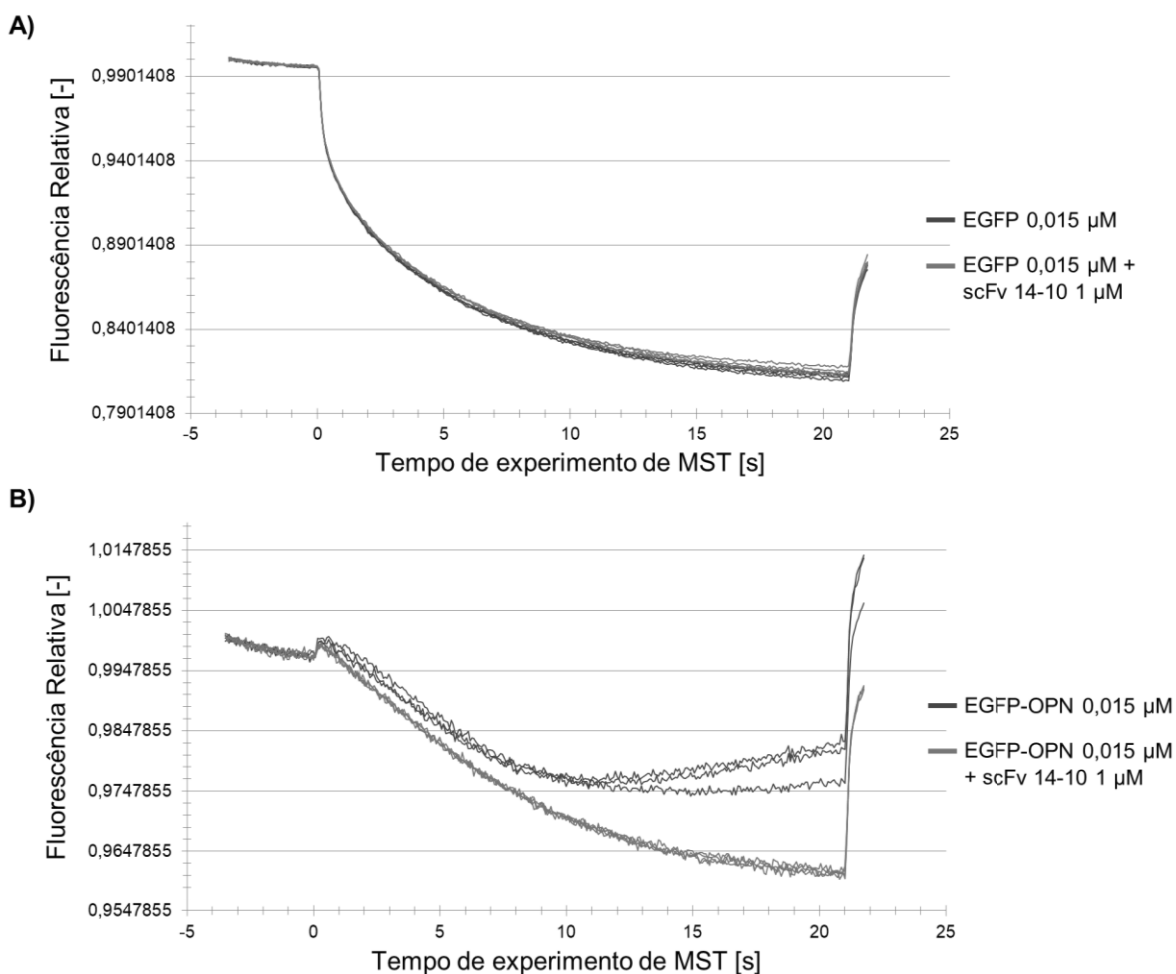
Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 conseguiram interagir com a osteopontina fusionada à EGFP (GRÁFICOS 5B e 6B, respectivamente), e não interagiram com o controle negativo EGFP (GRÁFICOS 5A e 6A, respectivamente), indicando que os fragmentos de anticorpos do tipo scFv se ligam de forma específica à osteopontina, e que o EGFP presente nesta amostra não tem influência nesta interação. É possível ainda observar o padrão de amplitude diferente gerado pela curva de osteopontina fusionada à EGFP e de EGFP, sendo a amplitude menor resultante de EGFP-OPN uma característica desta fusão.

GRÁFICO 5 – VERIFICAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv-14-8 E EXPERIMENTO CONTROLE EGFP E scFv 14-8



Curvas geradas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento de MST. 5A: Experimento controle. Curvas referentes à fluorescência emitida por quatro amostras contendo 0,015 μ M de EGFP em azul, e por três amostras contendo 0,015 μ M de EGFP com adição de 1 μ M de fragmento do tipo scFv 14-8 em verde. 5B: Curvas referentes à fluorescência emitida por quatro amostras contendo 0,015 μ M de osteopontina fusionada à EGFP em azul, e por três amostras contendo 0,015 μ M de osteopontina fusionada à EGFP com adição de 1 μ M de fragmento do tipo scFv 14-8 em verde. Curvas avaliadas no tempo de termoforese de 1,5 a 2,5 segundos.

GRÁFICO 6 – VERIFICAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE EGFP-OPN E scFv-14-10 E EXPERIMENTO CONTROLE EGFP E scFv 14-10



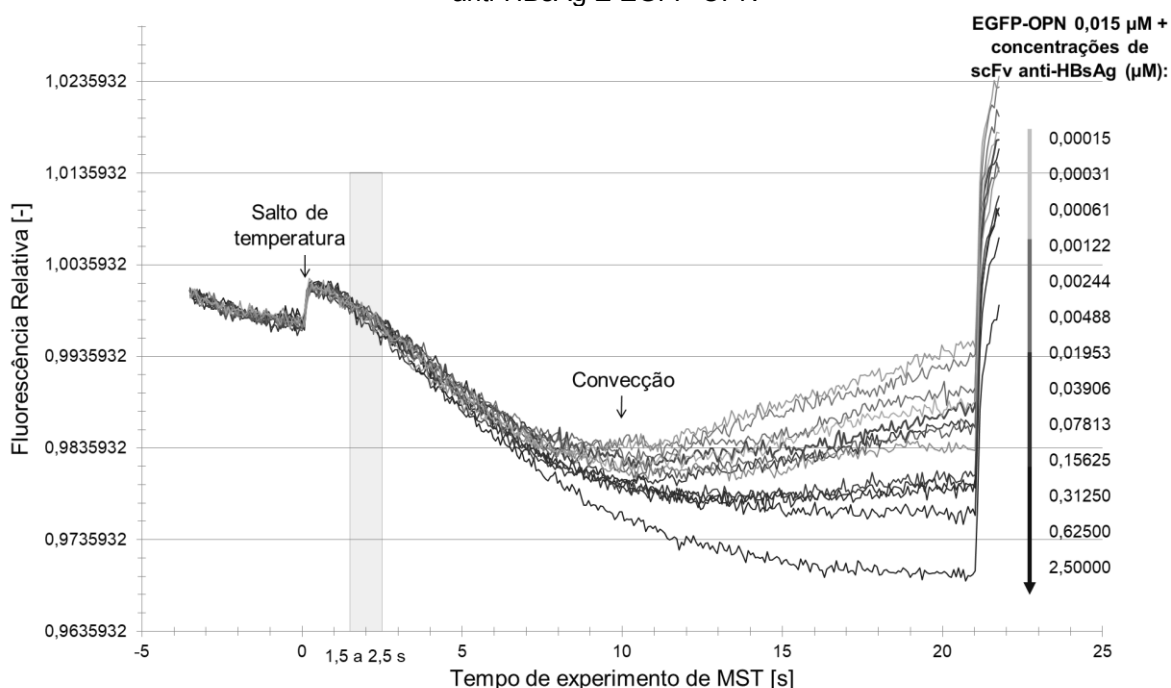
Curvas geradas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento de MST. 6A: Experimento controle. Curvas referentes à fluorescência emitida por quatro amostras contendo 0,015 μ M de EGFP em azul, e por quatro amostras contendo 0,015 μ M de EGFP com adição de 1 μ M de fragmento do tipo scFv 14-10 em verde. 6B: Curvas referentes à fluorescência emitida por três amostras contendo 0,015 μ M de osteopontina fusionada à EGFP em azul, e por quatro amostras contendo 0,015 μ M de osteopontina fusionada à EGFP com adição de 1 μ M de fragmento do tipo scFv 14-10 em verde. Curvas avaliadas no tempo de termoforese de 1,5 a 2,5 segundos.

Com a interação entre os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv 14-8 e 14-10 e a osteopontina confirmadas, foram realizados ensaios de interação com a utilização de diferentes concentrações dos anticorpos e 0,015 μ M da osteopontina fusionada à EGFP visando calcular a constante de dissociação. Visando utilizar um anticorpo que não consegue interagir com a osteopontina, também foi analisada a interação entre a osteopontina fusionada à EGFP e o scFv anti-HBsAg, como experimento controle. Foram realizadas diluições seriadas dos fragmentos de anticorpos, iniciando-se com uma concentração de 2,5 μ M e final de 0,00008 μ M, resultando em 16 concentrações diferentes. Em cada concentração foi

adicionado 0,015 μM de osteopontina fusionada à EGFP. Os experimentos foram realizados em triplicata.

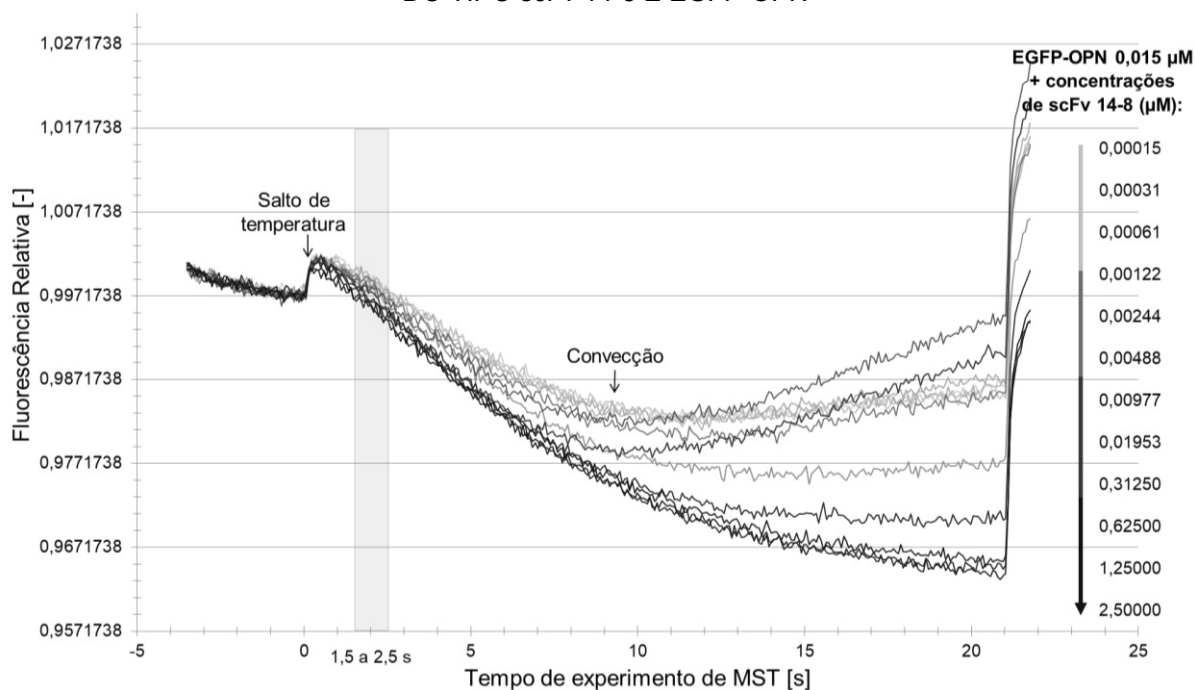
Os gráficos 7, 8 e 9 representam um dos três experimentos realizados para análise da afinidade de interação entre a EGFP-OPN e os fragmentos de anticorpos do tipo scFv anti-HBsAg (controle negativo), 14-8 e 14-10, respectivamente, demonstrando as curvas resultantes de cada concentração utilizada de anticorpo. É possível observar nestes gráficos o aumento da fluorescência em torno de 10 segundos, o oposto do esperado, já que as amostras deveriam perder a fluorescência ao longo do tempo. Esse fenômeno é chamado de fluxo convectivo (JERABEK-WILLEMSSEN et al., 2011), o qual é caracterizado pelo acúmulo de moléculas de densidades diferentes, e seu fluxo desordenado ao longo do gradiente de temperatura, não sendo, portanto, consequência do evento de termoforese. Devido a isso, para avaliação da constante de dissociação, foi necessário usar um tempo de experimento menor, no qual este fenômeno não esteja presente. O tempo selecionado foi de 1,5 segundos a 2,5 segundos.

GRÁFICO 7 – EXPERIMENTO CONTROLE ENTRE FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv anti-HBsAg E EGFP-OPN



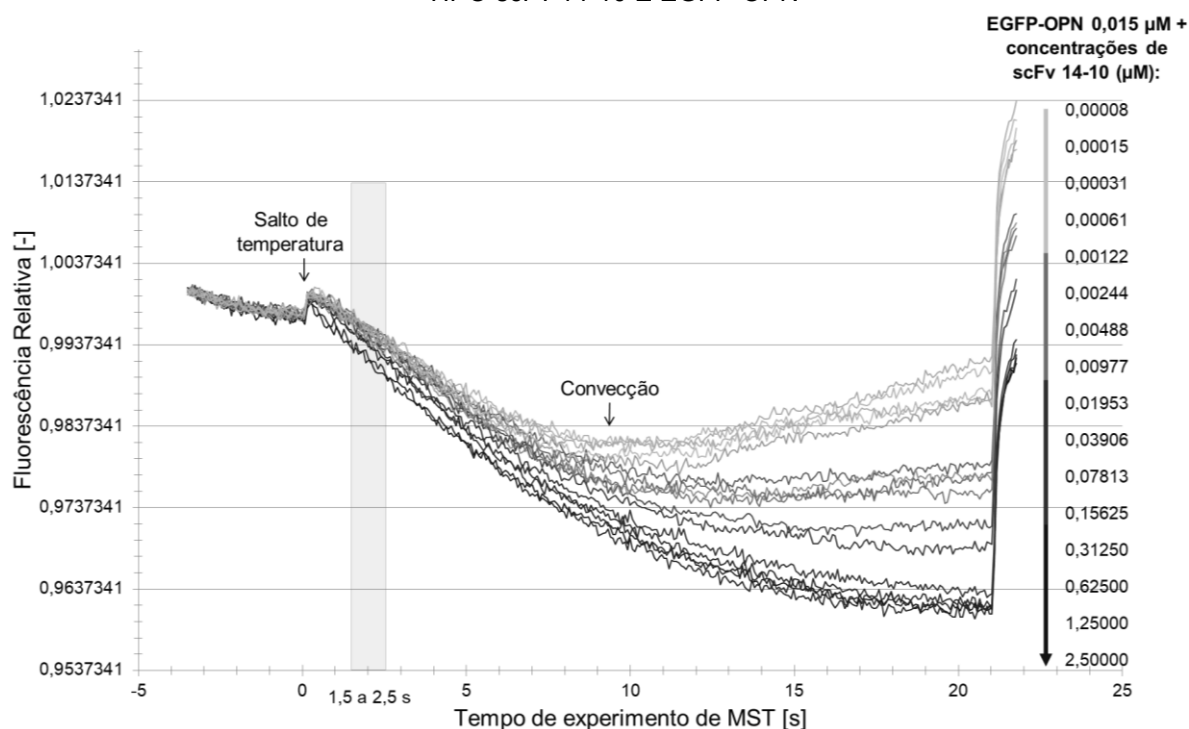
Curvas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento resultantes da concentração de 0,015 μM da osteopontina fusionada à EGFP em diferentes concentrações do scFv anti-HBsAg (2,5 μM a 0,00015 μM). O salto de temperatura se refere ao aumento da fluorescência no primeiro segundo em que o laser IR é ativado. É observada a convecção no tempo aproximado de 10 segundos, ocorrendo o aumento de fluorescência devido ao acúmulo de moléculas de densidades diferentes ao longo do gradiente de temperatura. Tempo selecionado para avaliação do experimento: 1,5 a 2,5 segundos (destacado em verde).

GRÁFICO 8 – CURVAS DE AFINIDADE DE INTERAÇÃO ENTRE FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-8 E EGFP-OPN



Curvas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento resultantes da concentração de 0,015 μM da osteopontina fusionada à EGFP em diferentes concentrações do scFv 14-8 (2,5 μM a 0,00015 μM). O salto de temperatura se refere ao aumento da fluorescência no primeiro segundo em que o laser IR é ativado. É observada a convecção no tempo aproximado de 9 segundos, ocorrendo o aumento de fluorescência devido ao acúmulo de moléculas de densidades diferentes ao longo do gradiente de temperatura. Tempo selecionado para avaliação do experimento: 1,5 a 2,5 segundos (destacado em verde).

GRÁFICO 9 – CURVA DE AFINIDADE DE INTERAÇÃO ENTRE FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-10 E EGFP-OPN



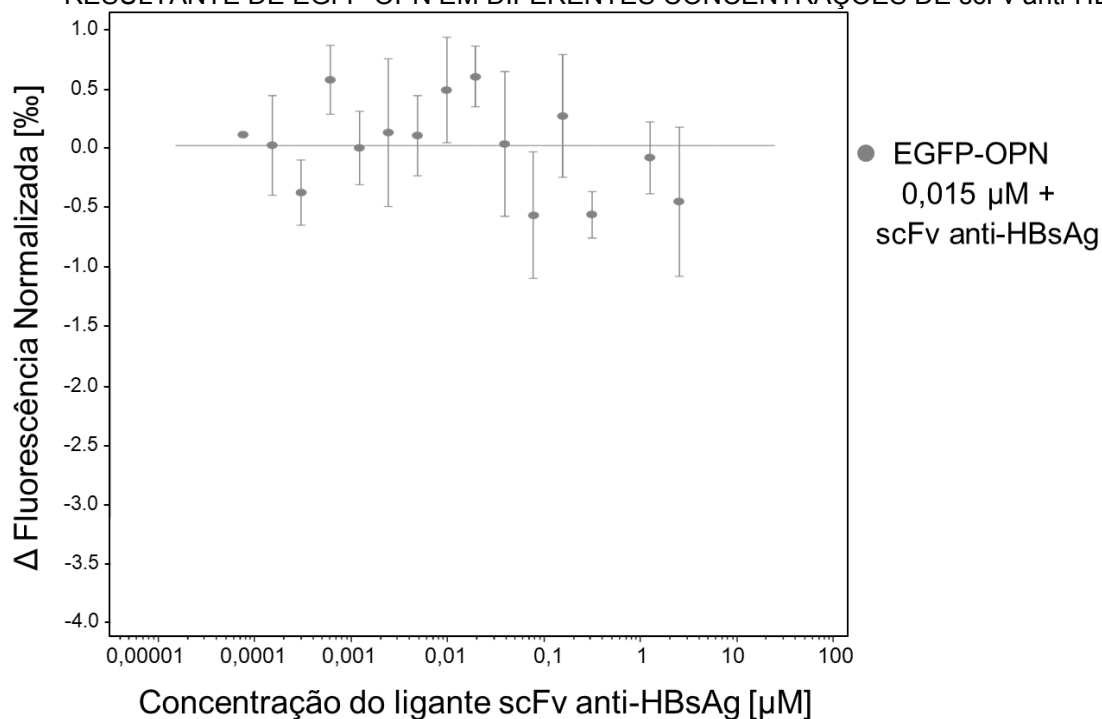
Curvas correspondentes à fluorescência relativa em relação ao tempo de experimento resultantes da concentração de 0,015 μM da osteopontina fusionada à EGFP em diferentes concentrações do scFv 14-10 (2,5 μM a 0,00008 μM). O salto de temperatura se refere ao aumento da fluorescência no primeiro segundo em que o laser IR é ativado. É observada a convecção no tempo aproximado de 9 segundos, ocorrendo o aumento de fluorescência devido ao acúmulo de moléculas de densidades diferentes ao longo do gradiente de temperatura. Tempo selecionado para avaliação do experimento: 1,5 a 2,5 segundos (destacado em verde).

É possível observar no experimento controle (GRÁFICO 7) que as curvas geradas com a utilização de diferentes concentrações do scFv anti-HBsAg não apresentaram uma diferença no tempo de 1,5 a 2,5 segundos, gerando curvas similares para altas e baixas concentrações deste anticorpo adicionado, e portanto, não demonstrando interação para a EGFP-OPN. Enquanto que para as diferentes concentrações dos fragmentos de anticorpo 14-8 e 14-10 (GRÁFICO 8 e GRÁFICO 9, respectivamente) adicionadas, foi possível observar uma diferença nas curvas geradas das altas e baixas concentrações, e por isso, foi possível observar que os fragmentos de anticorpos em concentrações mais altas conseguiram interagir com a EGFP-OPN.

Os pontos gerados no tempo de 1,5 segundos a 2,5 segundos das três curvas resultantes de cada experimento foram agrupados e realizada uma média destes para avaliar a constante de dissociação de cada fragmento de anticorpo.

O fragmento de anticorpo do tipo scFv anti-HBsAg não conseguiu interagir com a osteopontina fusionada à EGFP, já que não ocorreu mudança significativa de fluorescência de acordo com as concentrações de anticorpo utilizadas, e portanto, não foi possível estimar uma constante de dissociação para esta interação (GRÁFICO 10). Segundo o manual do equipamento, para o tempo de 1,5 segundos, o valor de amplitude é considerado adequado quando estiver acima de 1, para o tempo de 2,5 segundos é acima de 1,5, para o tempo de 5 segundos é acima de 2,5, para o tempo de 10 segundos é acima de 3,5, e para acima de 15 segundos é necessário que o valor seja acima de 5. O manual requer uma razão sinal para ruído, a qual é determinada pela amplitude dividida pelo ruído da medida, para concluir interação acima de 5, e considera acima de 12 uma interação excelente. Os valores de amplitude de 0,54 e de razão sinal para ruído de 1,6 resultantes da interação entre o anticorpo anti-HBsAg e a EGFP-OPN avaliada entre o tempo de 1,5 a 2,5 segundos não foram suficientes para concluir uma interação por este scFv. Isto demonstra que a osteopontina é reconhecida apenas pelos fragmentos de anticorpos do tipo scFv anti-osteopontina 14-8 e 14-10.

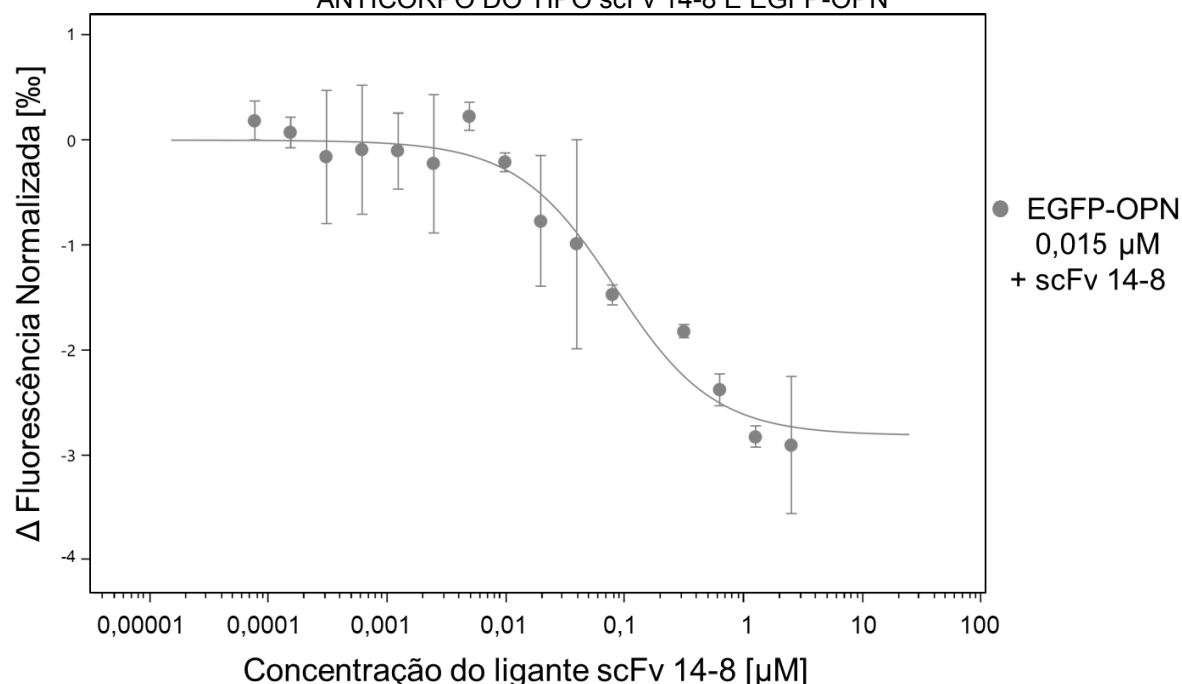
GRÁFICO 10 – EXPERIMENTO CONTROLE EM RELAÇÃO À FLUORESCÊNCIA NORMALIZADA RESULTANTE DE EGFP-OPN EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE scFv anti-HBsAg



Reta em verde gerada através da média de três experimentos avaliados no tempo de 1,5 a 2,5 segundos, correspondente à fluorescência normalizada em relação a diferentes concentrações do scFv anti-HbsAg e 0,015 μM de osteopontina fusionada à EGFP.

O fragmento scFv 14-8 interagiu com a EGFP-OPN (GRÁFICO 11), gerando curvas que apresentaram alterações na resposta da fluorescência de acordo com a concentração do anticorpo utilizada. A constante de dissociação estimada para este fragmento de anticorpo foi 0,0758 μM (75,8 nM), com amplitude de 2,82 e razão sinal para ruído de 13,7, sendo estes valores considerados adequados segundo o manual do equipamento.

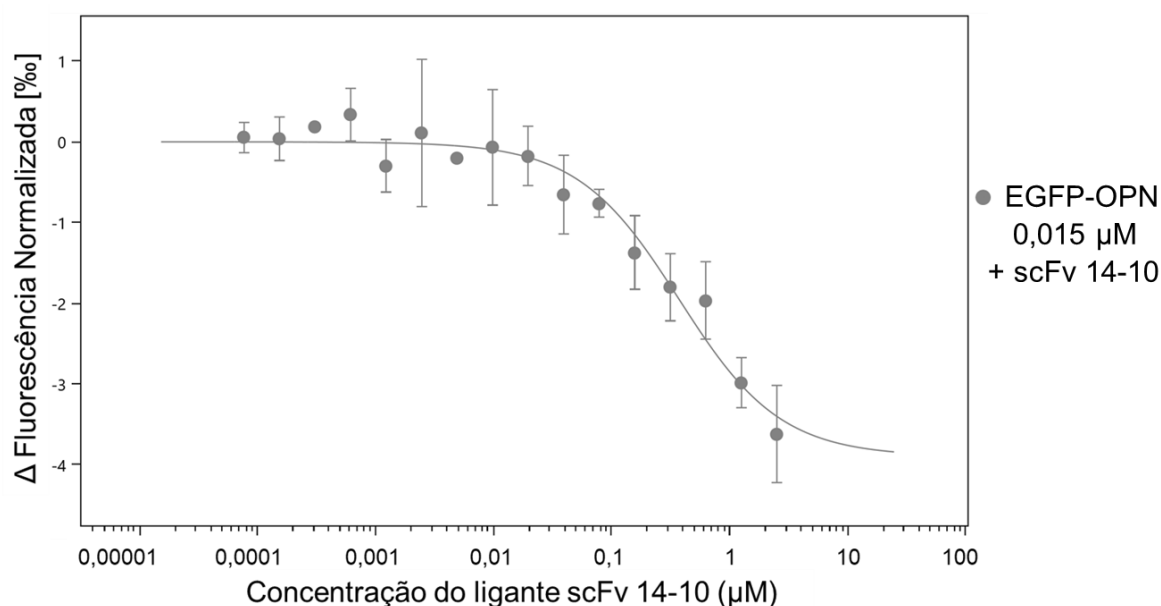
GRÁFICO 11 – CURVA DE CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO EM RELAÇÃO AO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-8 E EGFP-OPN



Curva de constante de dissociação (K_d), correspondente à fluorescência normalizada em relação à concentração do ligante scFv 14-8, gerada através da média das curvas de três experimentos avaliados no tempo de 1,5 a 2,5 segundos. Curva referente à interação de 0,015 μM de osteopontina fusionada à EGFP com diferentes concentrações do scFv 14-8 em verde. K_d estimada para scFv 14-8 e EGFP-OPN: 0,0758 μM .

Assim como o fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-8, o scFv 14-10 também interagiu com a osteopontina fusionada à EGFP, alterando a resposta da fluorescência de acordo com a concentração de anticorpo utilizada (GRÁFICO 12). A constante de dissociação estimada foi 0,3647 μM (364,7 nM), um valor maior que a K_d do fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-8, apresentando portanto, uma menor afinidade para a osteopontina que o outro anticorpo. O valor da amplitude gerado foi 3,90, e a razão sinal para ruído 17,9, sendo estes valores considerados adequados segundo o manual do equipamento.

GRÁFICO 12 – CURVA DE CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO EM RELAÇÃO AO FRAGMENTO DE ANTICORPO DO TIPO scFv 14-10 E EGFP-OPN



Curva de constante de dissociação (K_d), correspondente à fluorescência normalizada em relação à concentração do ligante scFv 14-10, gerada através da média das curvas de três experimentos avaliados no tempo de 1,5 a 2,5 segundos. Curva referente à interação de 0,015 µM de osteopontina fusionada à EGFP com diferentes concentrações do scFv 14-10 em verde. K_d estimada para scFv 14-10 e EGFP-OPN: 0,3647 µM.

A constante de dissociação do scFv 14-8 à osteopontina fusionada à EGFP foi menor do que o scFv 14-10. O fato do scFv 14-8 apresentar uma afinidade maior pode explicar o motivo de apenas este fragmento ter sido capaz de reconhecer a osteopontina fusionada à GST nos ensaios de *Western blot*, já que foram utilizadas concentrações iguais para os três anticorpos nestes ensaios.

A constante de dissociação que os fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 apresentaram foi similar ao de anticorpos descritos na literatura (BADESCU et al., 2016; MIN et al., 2016), os quais também apresentaram K_d em concentrações de nanomolar. Isso indica uma boa afinidade à osteopontina pelos fragmentos de anticorpos do tipo scFv, e um potencial uso no reconhecimento deste alvo.

4.14 TESTES DE LIGAÇÃO DA OSTEOPONTINA AOS SEUS RECEPTORES CELULARES

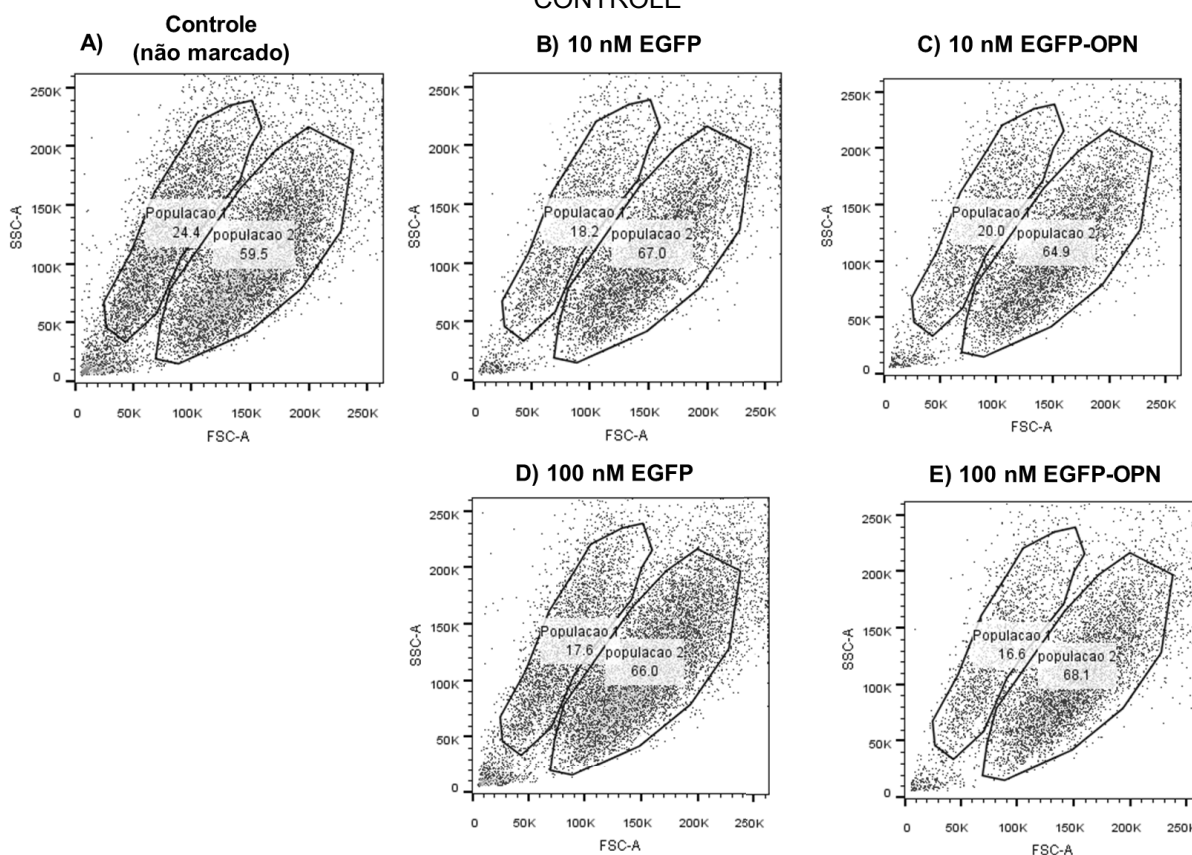
O ensaio para verificar se a osteopontina fusionada à EGFP consegue se ligar aos receptores celulares foi realizado através da utilização da linhagem celular THP-1 diferenciada por tratamento com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). Esta

diferenciação é necessária para garantir que pelo menos o receptor CD44 esteja presente na superfície celular uma vez que quando esta linhagem é submetida à diferenciação para macrófagos através da utilização de PMA ocorre a expressão de CD44 (ZHANG et al., 2014).

As células THP-1 foram cultivadas em placas de seis poços, diferenciadas com 100 nM de PMA e incubadas com 10 e 100 nM de EGFP-OPN e de EGFP. Também foi realizado um ensaio controle (não marcado), com as células diferenciadas sem a adição de proteínas. Foram obtidos aproximadamente 10000 eventos de cada amostra e analisados por citometria de fluxo.

Foi possível observar a presença de duas populações para cada amostra (FIGURA 41), as quais podem ser correspondentes a diferentes estágios da diferenciação com PMA nas células THP-1.

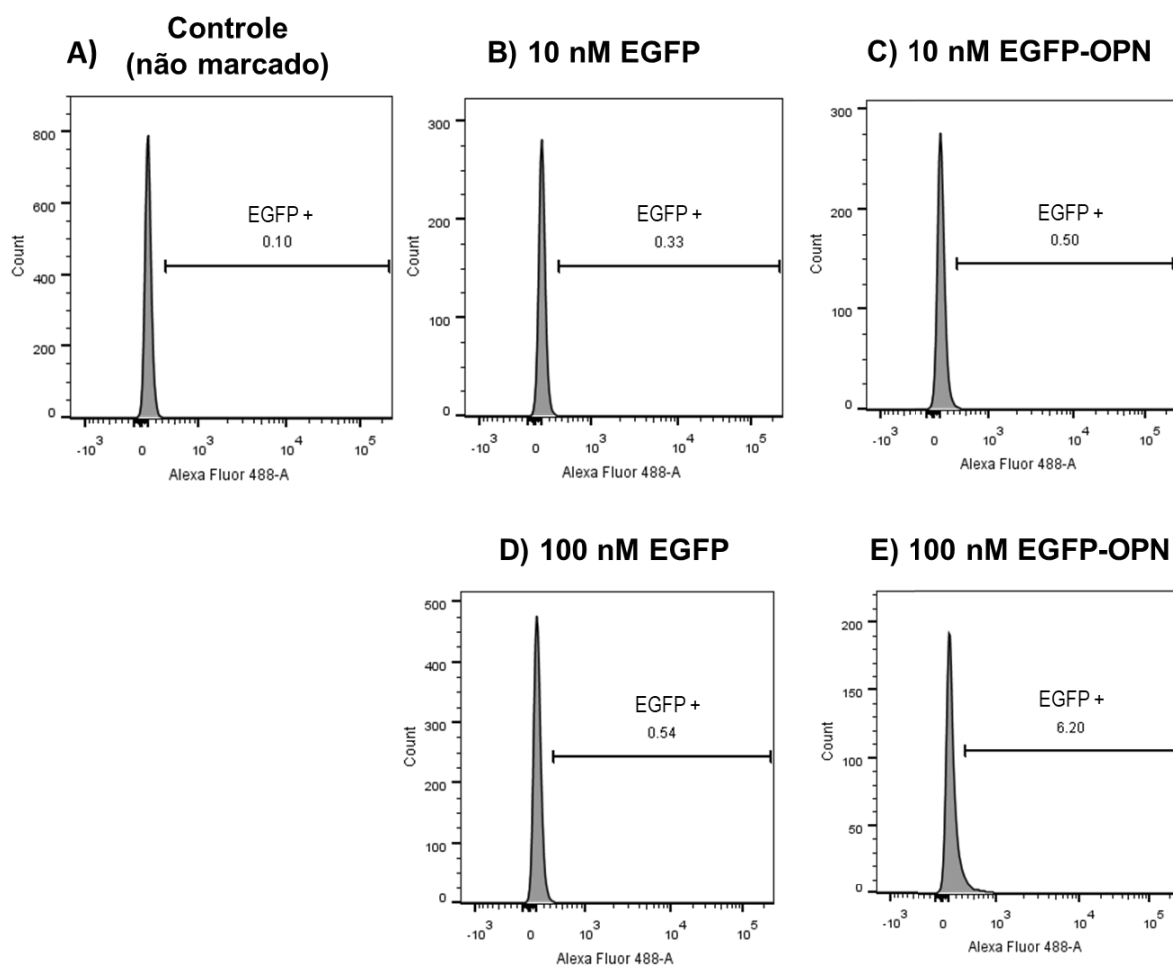
FIGURA 41 - ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO DEMONSTRANDO AS DUAS POPULAÇÕES DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 10 e 100 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE



Análise por citometria de fluxo demonstrando o *dot-plot*, através da correlação de SSC e FSC, de duas populações presentes na linhagem celular THP-1 diferenciada com PMA. 41A: Controle (não marcado): sem adição de proteínas às células. 41B: Células incubadas com 10 nM de EGFP. 41C: Células incubadas com 10 nM de EGFP-OPN. 41D: Células incubadas com 100 nM de EGFP. 41E: Células incubadas com 100 nM de EGFP-OPN.

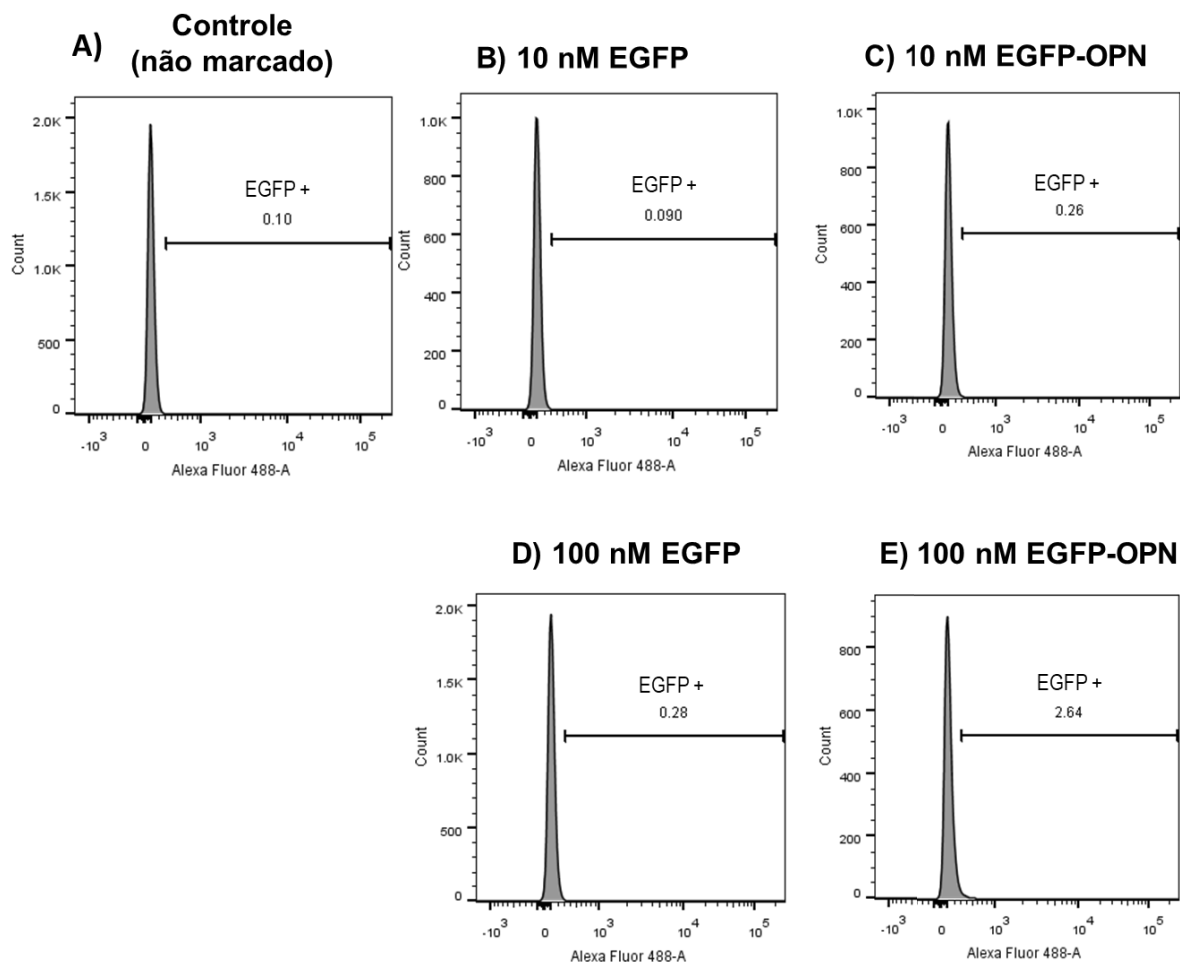
A quantidade de células fluorescentes de cada população foi avaliada. Para a população 1 (FIGURA 42) não foi possível observar uma diferença entre a quantidade de células que emitiram fluorescência (EGFP+) das células não marcadas (FIGURA 42A) e incubadas com 10 nM de EGFP (FIGURA 42B) ou 10 nM de EGFP-OPN (FIGURA 42C). Enquanto que para a incubação com 100 nM de EGFP-OPN (FIGURA 42E), foi possível observar que 6,20% das células emitiram fluorescência, esse valor foi de apenas 0,54% para as células incubadas apenas com EGFP (FIGURA 42D). Para a população 2 (FIGURA 43), também foi possível observar que a quantidade de células fluorescentes não marcadas (FIGURA 43A) e incubadas com 10 nM de EGFP (FIGURA 43B) ou 10 nM de EGFP-OPN (FIGURA 43C) não apresentou diferença. Enquanto que foi possível observar que 2,64% de células emitiram fluorescência quando incubadas com 100 nM de EGFP-OPN (FIGURA 43E), e apenas 0,28% emitiram quando incubadas com 100 nM de EGFP (FIGURA 43D).

FIGURA 42 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 1 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 10 e 100 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE



Histogramas provenientes da população 1 das células THP-1, demonstrando o número de células em função da fluorescência, e a porcentagem de células EGFP positivas (EGFP +). 42A: Controle (não marcado), sem adição de proteínas às células. 42B: Células incubadas com 10 nM de EGFP. 42C: Células incubadas com 10 nM de EGFP-OPN. 42D: Células incubadas com 100 nM de EGFP. 42E: Células incubadas com 100 nM de EGFP-OPN.

FIGURA 43 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 2 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 10 e 100 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE



Histogramas provenientes da população 2 das células THP-1, demonstrando o número de células em função da fluorescência, e a porcentagem de células EGFP positivas (EGFP +). 43A: Controle (não marcado): sem adição de proteínas às células. 43B: Células incubadas com 10 nM de EGFP. 43C: Células incubadas com 10 nM de EGFP-OPN. 43D: Células incubadas com 100 nM de EGFP. 43E: Células incubadas com 100 nM de EGFP-OPN.

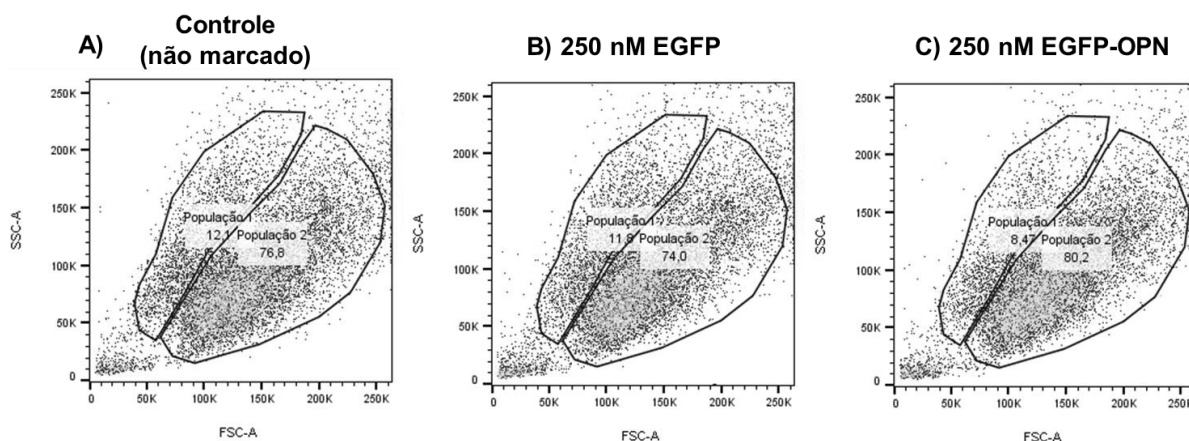
Através destes ensaios, foi possível observar um aumento da fluorescência para as duas populações das células quando incubadas com 100 nM de EGFP-OPN, em relação a proteína controle EGFP. A quantidade de células fluorescentes demonstra que a osteopontina está conseguindo se ligar aos receptores celulares desta linhagem. Essa quantidade ainda pode ser otimizada através de testes utilizando concentrações maiores de proteínas e diferentes tempos de incubação.

Para uma otimização deste ensaio, foi realizado um novo experimento, no qual as células foram cultivadas em placas de Petri (35 x 10 mm), diferenciadas com 100 nM PMA e incubadas com 250 nM de EGFP e EGFP-OPN. Também foi realizado um ensaio controle (não marcado), com as células diferenciadas sem a

adição de proteínas. Foram obtidos aproximadamente 20000 eventos de cada amostra e analisados por citometria de fluxo.

Assim como no primeiro experimento, também foi possível observar a presença de duas populações para cada amostra (FIGURA 44).

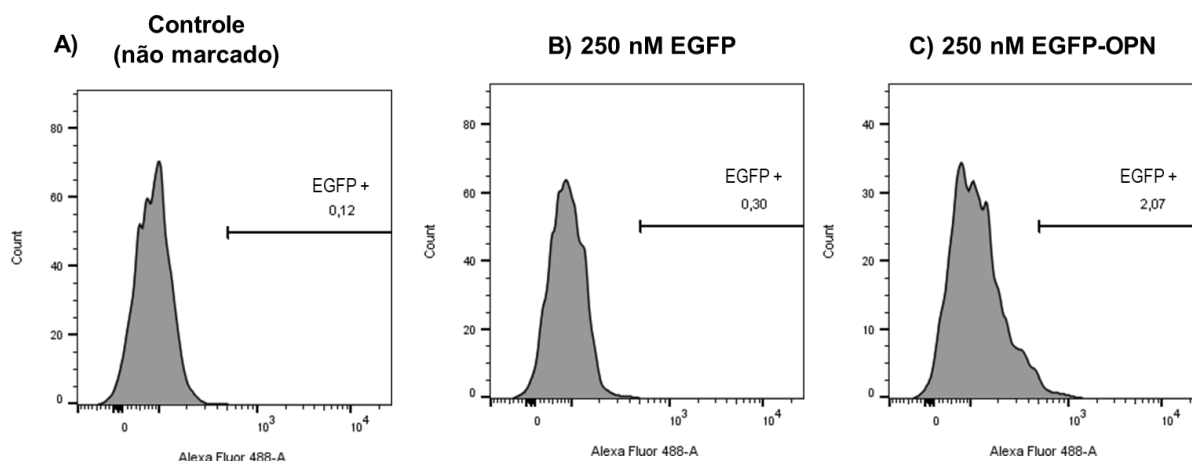
FIGURA 44 - ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO DEMONSTRANDO AS DUAS POPULAÇÕES DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE



Análise por citometria de fluxo demonstrando o *dot-plot*, através da correlação de SSC e FSC, de duas populações presentes na linhagem celular THP-1 diferenciada com PMA. 44A: Controle (não marcado): sem adição de proteínas às células. 44B: Células incubadas com 250 nM de EGFP. 44C: Células incubadas com 250 nM de EGFP-OPN.

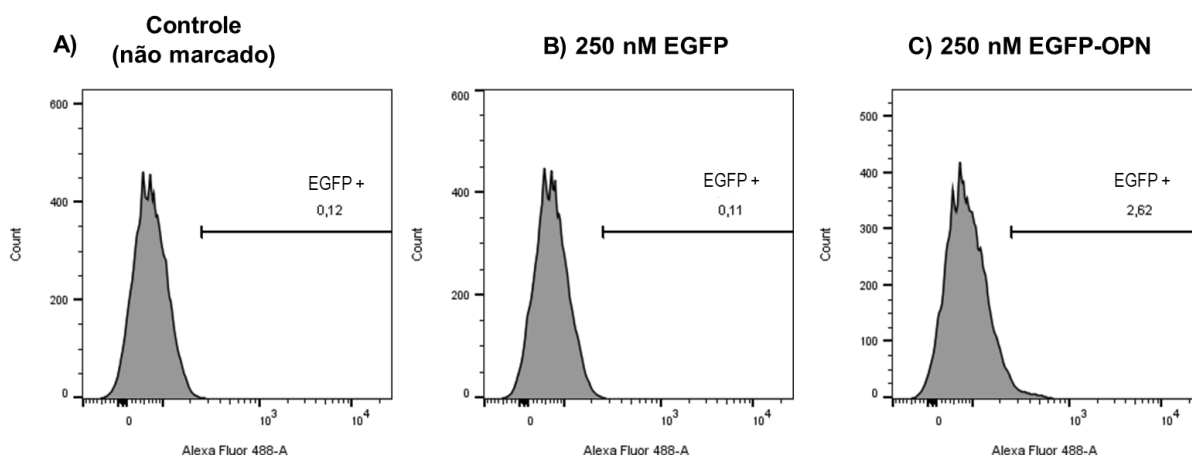
A quantidade de células fluorescentes de cada população foi avaliada. Para a população 1 (FIGURA 45), foi possível observar que 2,07% das células incubadas com EGFP-OPN emitiram fluorescência (FIGURA 45C), enquanto que esse valor foi de apenas 0,30% para as células incubadas apenas com EGFP (FIGURA 45B), as quais apresentaram um valor similar ao das células fluorescentes não marcadas (FIGURA 45A). Para a população 2 (FIGURA 46), também foi possível observar que a quantidade de células fluorescentes não marcadas (FIGURA 46A) e incubadas com 250 nM de EGFP (FIGURA 46B) não apresentou diferença. Enquanto que 2,62% de células emitiram fluorescência quando incubadas com 250 nM de osteopontina fusionada à EGFP (FIGURA 46C).

FIGURA 45 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 1 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE



Histogramas provenientes da população 1 das células THP-1, demonstrando o número de células em função da fluorescência, e a porcentagem de células EGFP positivas (EGFP +). 45A: Controle (não marcado): sem adição de proteínas às células. 45B: Células incubadas com 250 nM de EGFP. 45C: Células incubadas com 250 nM de EGFP-OPN.

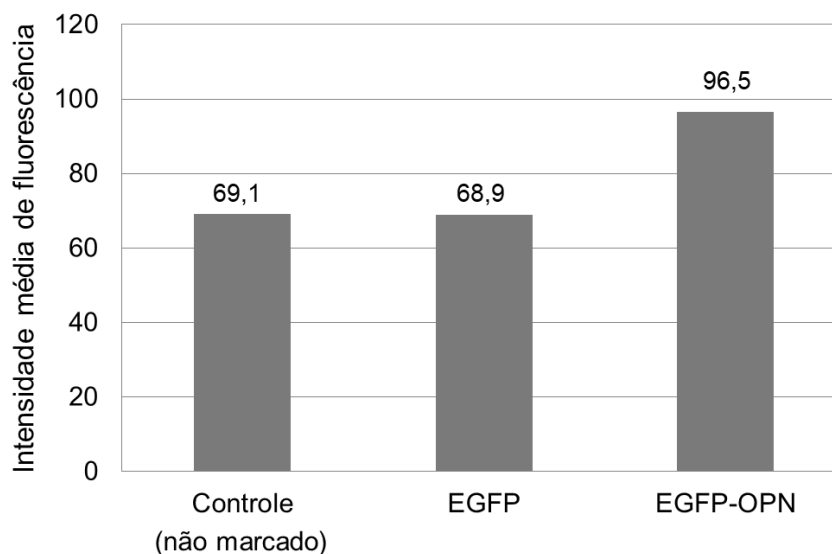
FIGURA 46 - HISTOGRAMAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO 2 DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE



Histogramas provenientes da população 2 das células THP-1, demonstrando o número de células em função da fluorescência, e a porcentagem de células EGFP positivas (EGFP +). 46A: Controle (não marcado): sem adição de proteínas às células. 46B: Células incubadas com 250 nM de EGFP. 46C: Células incubadas com 250 nM de EGFP-OPN.

Também foi avaliada a intensidade média de fluorescência emitida pela população total das células THP-1 (GRÁFICO 13). Não foi possível observar uma diferença entre a intensidade média de fluorescência emitida pelas células não marcadas (69,1) e pelas células incubadas com EGFP (68,9), enquanto que a intensidade média de fluorescência emitida pela EGFP-OPN foi de 96,5, apresentando uma intensidade maior em relação aos dois controles.

GRÁFICO 13 – INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELA POPULAÇÃO TOTAL DAS CÉLULAS THP-1 INCUBADAS COM 250 nM DE EGFP E EGFP-OPN E EXPERIMENTO CONTROLE



Intensidade média de fluorescência emitida pela população total das células THP-1 incubadas com 250 nM de EGFP e de EGFP-OPN e experimento controle (não marcado): sem adição de proteínas às células.

Os resultados demonstram que a osteopontina consegue se ligar aos receptores celulares, e que este ensaio utilizado é viável para a realização de posterior análise da ligação dos fragmentos de anticorpos recombinantes à osteopontina, já que estes podem competir com os receptores pela ligação da EGFP-OPN, diminuindo a intensidade da fluorescência.

Além disso, uma vez que a osteopontina seja capaz de induzir a produção de citocinas inflamatórias, poderá ser avaliado se o resultado da interação da osteopontina com as células THP-1 aumenta a produção da citocina inflamatória IL-12 e se a ligação dos fragmentos de anticorpos recombinantes à osteopontina ocasiona a redução ou inibição da produção destas. A quantificação da citocina IL-12 será realizada por ELISA, através da utilização de anticorpos comerciais.

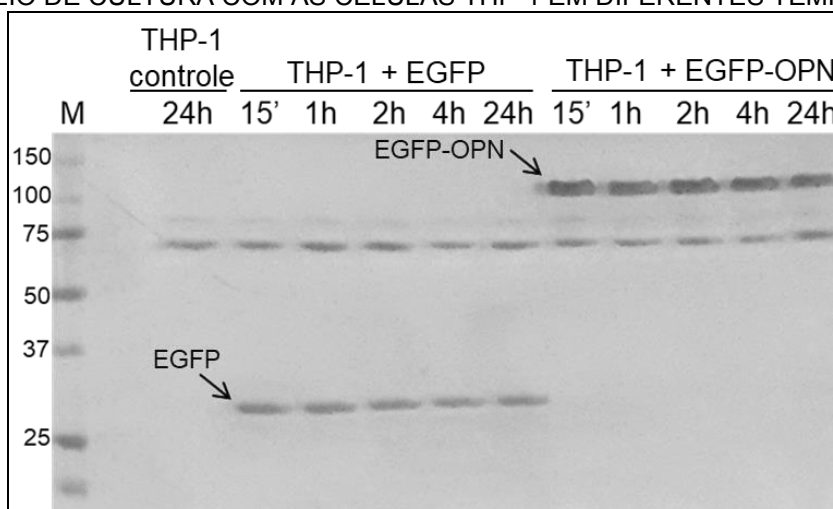
4.15 TESTE DE ESTABILIDADE DE EGFP-OPN E EGFP EM MEIO DE CULTURA COM AS CÉLULAS THP-1

O teste para verificar a estabilidade das proteínas EGFP-OPN e EGFP em meio de cultura com as células foi realizado através de células THP-1 diferenciadas com 100 nM de PMA durante 72 horas, e incubadas com 1 μ M das proteínas. Os sobrenadantes de cada tempo de incubação, e do controle negativo sem a

incubação de proteínas foram submetidos à análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida (FIGURA 47).

As proteínas EGFP e EGFP-OPN permaneceram estáveis em todos os tempos de incubação, inclusive quando incubadas durante 24 horas. Com este teste, é possível concluir que ambas as proteínas EGFP e EGFP-OPN são estáveis no meio de cultura Opti-MEM pH 7,4 utilizado para suas incubações com as células THP-1.

FIGURA 47 - TESTE DE ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS EGFP-OPN E EGFP INCUBADAS EM MEIO DE CULTURA COM AS CÉLULAS THP-1 EM DIFERENTES TEMPOS



Gel de poliacrilamida 13% para análise da estabilidade que as proteínas EGFP-OPN e EGFP apresentam nos tempos de incubação de 15 minutos (15'), 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. THP-1 Controle: Células THP-1 diferenciadas com PMA sem a adição de proteínas. Setas indicam a proteína EGFP e a fusão EGFP-OPN. M: *Precision plus protein all blue standards (Bio-Rad)*.

5 CONCLUSÕES

Devido ao baixo nível de expressão do Fab 14-10, e ao Fab 14-8 não ter sido produzido, não foi possível comparar qual formato de fragmento de anticorpo é mais eficiente para produção e apresenta maior afinidade para o alvo. A baixa taxa de eficiência na integração de genes no genoma de *Pichia pastoris* e a sua instabilidade genética podem ser um dos motivos para que mesmo que o material genético das colônias tenha sido confirmado pela integração do cassete de expressão contendo os genes sintéticos, ainda assim não ter sido capaz de produzir o fragmento de anticorpo do tipo Fab 14-8.

A expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv com peptídeo sinal para endereçamento ao periplasma, através do vetor pET22b, e sem este peptídeo sinal (vetor pET28b) não apresentou diferença.

Os fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv, e a osteopontina fusionada à EGFP e à GST foram expressos em *E. coli* e purificados parcialmente por cromatografia de afinidade. Para a purificação completa destas proteínas, seriam necessárias novas etapas de purificação, como a troca iônica e exclusão por tamanho.

Através de ensaios de *Western blot* foi possível observar a detecção da osteopontina fusionada à GST apenas pelo fragmento de anticorpo do tipo scFv 14-8 purificado parcialmente do extrato solúvel.

Através do ensaio de termoforese em microescala, uma técnica muito mais sensível que o ensaio de *Western blot*, foi possível observar que todos os fragmentos de anticorpos do tipo scFv conseguiram interagir com a osteopontina fusionada à EGFP. Sendo possível concluir que a produção dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv foi eficiente, pois mantiveram a sua parte funcional, ao conseguirem reconhecer sua proteína-alvo.

Através do ensaio de termoforese em microescala, também foi estimada a constante de dissociação dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv 14-8 e 14-10 para a osteopontina, sendo estes valores 75,8 nM e 364,7 nM, respectivamente. Com os valores de K_d que estes fragmentos obtiveram, é possível concluir que eles têm um grande potencial para uso no reconhecimento da osteopontina.

Através dos ensaios de citometria de fluxo, foi possível observar que a osteopontina fusionada à EGFP conseguiu se ligar aos receptores das células THP-1 diferenciadas, e que este modelo experimental é viável para testar os competidores da ligação.

Através do teste de estabilidade em diferentes tempos de incubação, é possível concluir que as proteínas EGFP-OPN e EGFP permanecem estáveis quando incubadas no meio de cultura com as células THP-1.

6 PERSPECTIVAS

Com os reagentes produzidos será possível realizar o ensaio para verificar se os fragmentos de anticorpos recombinantes conseguem inibir as ações induzidas pela osteopontina, através da competição da ligação da osteopontina aos seus receptores celulares, e também avaliar se o resultado da interação da osteopontina com as células THP-1 aumenta a produção da citocina inflamatória IL-12 e se a ligação dos fragmentos de anticorpos à osteopontina reduz ou inibe a produção desta citocina.

REFERÊNCIAS

- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2016.
- ASHKAR, S. et al. Eta-1 (Osteopontin): An Early Component of Type-1 (Cell-Mediated) Immunity. **Science**, v. 287, n. 5454, p. 860–864, 2000.
- BADESCU, G. O. et al. Kinetic characterisation of a single chain antibody against the hormone abscisic acid: Comparison with its parental monoclonal. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.
- BRIONES-ORTA, M. A. et al. Osteopontin splice variants and polymorphisms in cancer progression and prognosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 93–108, 2017.
- ÇALIK, P. et al. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 12, p. 1628–1635, 2010.
- CHRISTENSEN, B. et al. Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 7929–7937, 2010.
- DU, J. et al. Molecular Basis of Recognition of Human Osteopontin by 23C3, a Potential Therapeutic Antibody for Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Journal of Molecular Biology**, v. 382, n. 4, p. 835–842, 2008.
- FISHER, L. W. et al. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 2, p. 460–465, 2001.
- FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JUL, p. 1–20, 2013.
- FRENZEL, D. F.; WEISS, J. M. Osteopontin and allergic disease: pathophysiology and implications for diagnostics and therapy. **Expert review of clinical immunology**, v. 7, n. 1, p. 93–109, 2011.
- GIACHELLI, C. M.; STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. **Matrix Biology**, v. 19, n. 7, p. 615–622, 2000.
- GRANT, S. G. N. et al. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4645–4649, 1990.
- GUPTA, R. A. et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to

promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071–1076, 2010.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 0, n. 0, p. in press, 2016.

HESLING, C. et al. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome associated protein interacts with HsNip7 and its down-regulation affects gene expression at the transcriptional and translational levels. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 20, p. 4180–4195, 2007.

INOUE, M.; SHINOHARA, M. L. Intracellular osteopontin (iOPN) and immunity. **Immunologic Research**, v. 49, n. 1–3, p. 160–172, 2011.

JERABEK-WILLEMSSEN, M. et al. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 342–353, 2011.

JIN, Y. et al. Overexpression of Osteopontin, $\alpha\beta 3$ and Pim-1 Associated with Prognostically Important Clinicopathologic Variables in Non-Small Cell Lung Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–5, 2012.

JUNAID, A. et al. Osteopontin localizes to the nucleus of 293 cells and associates with polo-like kinase-1. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 2, p. C919–C926, 2007.

KREMERS, G. J. et al. Improved green and blue fluorescent proteins for expression in bacteria and mammalian cells. **Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 3775–3783, 2007.

KUMAR, S. et al. **Humanized antibodies specific for amino acid sequence RGD of an extracellular matrix protein and the uses thereof**. US 8614296 B2. 24 abr. 2009, 24 dez. 2013.

KUMAR, S.; TSO, J.Y.; TSURUSHITA, N. **Humanized antibodies specific for amino acid sequence rgd of an extracellular matrix protein and the uses thereof**. US20120219503 A1. 22 set. 2010, 30 ago. 2012.

LI, Z. et al. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 3, p. 438–445, 2001.

LIFE TECHNOLOGIES. **Pichia Expression KitManual**, 2014.

LÖÖKE, M.; KRISTJUAHAN, K.; KRISTJUHAN, A. Extraction of Genomic Dna From Yeasts for Pcr- Based Applications. **Biotechniques**, v. 50, n. 5, p. 325–328, 2011.

LUND, S. A.; GIACHELLI, C. M.; SCATENA, M. The role of osteopontin in inflammatory processes. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 3, n. 3–4, p. 311–322, 2009.

MIN, W. K. et al. Affinity improvement by fine tuning of single-chain variable fragment against aflatoxin B1. **Food Chemistry**, v. 209, p. 312–317, 2016.

MOON, M. H. et al. Measuring RNA-Ligand Interactions with Microscale Thermophoresis. **Biochemistry**, p. acs.biochem.7b01141, 2018.

MURUGAIYAN, G.; MITTAL, A.; WEINER, H. L. Increased Osteopontin Expression in Dendritic Cells Amplifies IL-17 Production by CD4+ T Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and in Multiple Sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 11, p. 7480–7488, 2008.

NANOTEMPER TECHNOLOGIES GMBH. User Manual for the Monolith NT.115. 2007.

NASSER, M. W. et al. Evaluation of Yeast as an Expression System. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 477–493, 2003.

PLATZER, G. et al. The metastasis-associated extracellular matrix protein osteopontin forms transient structure in ligand interaction sites. **Biochemistry**, v. 50, n. 27, p. 6113–6124, 2011.

SCHOLZ, C. et al. Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, n. 5, p. 1229–1241, 2005.

SEIDEL, S. Nanoliter-Droplet Thermophoresis for Biomedical Applications. p. 1–49, 2014.

SEIDEL, S. A. I. et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. **Methods**, v. 59, n. 3, p. 301–315, 2013.

SHEVDE, L. A. et al. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. **Current molecular medicine**, v. 10, n. 1, p. 71–81, 2010.

SHIMIZU, Y. et al. Plasma osteopontin levels are associated with disease activity in the patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. **Journal of Neuroimmunology**, v. 263, n. 1–2, p. 148–151, 2013.

SHINOHARA, M. L. et al. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 20, p. 7235–7239, 2008.

SMITH, O. P. Shwachman-Diamond syndrome. **Seminars in Hematology**, v. 39, n. 2, p. 95–102, 2002.

SODEK, J.; BATISTA DA SILVA, A P.; ZOHAR, R. Osteopontin and mucosal protection. **Journal of dental research**, v. 85, p. 404–415, 2006.

SONG, G. et al. Osteopontin promotes ovarian cancer progression and cell survival

and increases HIF-1 α expression through the PI3-K/Akt pathway. **Cancer science**, v. 99, n. 10, p. 1901–7, 2008.

STEITZ, S. A. et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. **American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 2035–2046, 2002.

THORAT, D. et al. Association of osteopontin and cyclooxygenase-2 expression with breast cancer subtypes and their use as potential biomarkers. **Oncology Letters**, v. 6, n. 6, p. 1559–1564, 2013.

TILLI, T. M. et al. Both osteopontin-c and osteopontin-b splicing isoforms exert pro-tumorigenic roles in prostate cancer cells. **Prostate**, v. 72, n. 15, p. 1688–1699, 2012.

TIWARI, A. et al. Enhanced periplasmic expression of high affinity humanized scFv against Hepatitis B surface antigen by codon optimization. **Protein Expression and Purification**, v. 74, n. 2, p. 272–279, 2010.

VAN DEN BOGAART, G. et al. Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of SNARE nucleation. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 18, n. 7, p. 805–812, 2011.

WAN, L. et al. High-level expression of a functional humanized single-chain variable fragment antibody against CD25 in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 33–41, 2008.

YAMAMOTO, N. et al. Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 2, p. 181–188, 2003.

YAN, S. Z. et al. The Regulation of Type 7 Adenylyl Cyclase by its C1b Region and *Escherichia coli* Peptidylprolyl Isomerase, SlyD. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 8500–8506, 2001.

YANG, G. et al. Osteopontin enhances the expression of HOTAIR in cancer cells via IRF1. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 9, p. 837–848, 2014.

YUAN, Y. et al. Expression and purification of bioactive high-purity recombinant mouse SPP1 in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 2, p. 421–432, 2014.

ZHANG, G. et al. CD44 clustering is involved in monocyte differentiation. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 7, p. 540–547, 2014.

ZHU, T. et al. A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 5, p. 679–684, 2009.

ANEXO A – SEQUÊNCIAS DOS GENES SINTÉTICOS QUE CODIFICAM OS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO scFv e Fab CONTRA OSTEOPONTINA

Em azul: Sítio de restrição de EcoRI.

Em verde: Sítio de restrição de NcoI.

Sublinhado em roxo: sequência que codifica a cadeia pesada de scFv

Negrito e sublinhado em vermelho: sequência que codifica linker contendo glicinas e serinas

Sublinhado em preto: sequência que codifica a cadeia leve de scFv

Em laranja: Sítio de restrição de XhoI

Negrito em azul: sequência que codifica hexa-histidina.

Em rosa: Sítio de restrição de NotI

Sequência do gene sintético que codifica o scFv 14-8:

GAATTCACCATGGCTGAAGTCCAACCTGGTCGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAACCGAAAGGTA
GTCTGAAAATCTCGTGTGCGGCAAGCGGTTTTACGTTTAAATTTATGCAATGAATTGGGTTCGTC
AGGCTCCGGGCAAAGGTCTGGAATGGGTGCGACGTATCCGCAGTCAGTCCAACAATTACACCAC
GTATTACGCTGATTCAGTCAAAGACCGTTTTACCATTTCGCGCGATGACTCACAGTCGATGCTGTA
TCTGCAAATGAACAATCTGAAAACGGAAGATACCGCGATGTATTACTGCGTGCGCCAGATGGGTG
ACTACTGGGGCCAAGGTACCACGCTGACGGTTAGCTCTGCCGGCGGTGGCGGTTTCAGGCGGTG
GCGGTTTCGGGCGGTGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGTTCTTATATCCAGATGACCCAAAGTCCGG
CAAGCCTGTCTGTGAGTGTGGCGAAACCGTTACGATTACCTGTCGTGCGAGTGAACATCTAT
TCCTTCCTGGCCTGGTACCAGCAAAAACAGGGTAAAAGCCCGCAACTGCTGGTCTATGCAGCAA
CCAACCTGGCAGATGGTGTGCCGTACGCTTTTCCGGCTCAGGTTCTGGGCACGCAGTTCTCTCT
GAAAATCAACAGCCTGCAATCTGAAGATTTTCGGTACCTATTACTGCCAGCATTTCTGGGGCACGC
CGTTTACCTTCGGTAGCGGCACCAAACCTGGAAATCAAACGTAGTGGCGGTTCCCTCGAGCACCA
TCACCACCATCACTAAGCGGCCGC

Sequência do gene sintético que codifica o scFv 14-9:

GAATTCACCATGGCTGAAGTCAAACCTGGTCTGAATCGGGCGGCGGCCTGGTCCAACCGGGCGGC
 TCCCTGTCCCTGTCTGTGCTGCCTCTGGCTTTACGTTACCGATTATTACATGATTTGGGTCCGT
 CAGCCGCCGGGTAAAGCACTGGAATGGCTGGGTTTTATCCGCAACAAAGCGAATGGCTATACCA
 CGGAATACAGTGCCTCCGTAAAGGTCGTTTCACCATTTTCGCGCGATAACTCACAGTCGATCCTG
 TATCTGCAAATGAATGCGCTGCGTGCCGAAGACTCAGCAACGTATTACTGCGCACGCGGCGCTT
 ACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTGACGGTTTTCTGCTGGCGGTGGCGGTTCTGGGCGGTGGCGGTA
 GCGGCGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTAGTGATGTGCTGATGACCCAAACGCCGCTGTGCG
 TGCCGGTTAGCCTGGGTGACCAGGCGAGCATTTCTTGTCTAGCTCTCAATCTATCGTGCATAGT
 AACGGCAATACCTATCTGGAATGGTACCTGCAGAAACCGGGTCAAAGTCCGAAACTGCTGATTTA
 TCGTGTCTCCAACCGCTTTTCAGGTGTGCCGGATCGTTTCAGTGGTTCCGGCTCAGGTACCGACT
 TTACGCTGAAAATCTCCCGCGTTGAAGCCGAAGATCTGGGCGTCTATTACTGCTTTTCAGGGTTCA
 TTCGTTCCGTGGACCTTCGGCGGTGGCACGAAACTGGAAATTAAGGTGGCAGCCTCGAGCACC
 ATCACCACCATCACTAAGCGGCCGC

Sequência do gene sintético que codifica o scFv 14-10:

GAATTCACCATGGCTGAAGTCCAACCTGGTCTGAATCGGGCGGCGGTCTGGTCCAACCGGGCGGC
 TCACTGCGTCTGTCTGTGCTGCGTCGGGCTTTACCTTTACCGATTATTACATGATTTGGGTTCGT
 CAGGCACCGGGCAAAGGTCTGGAATGGCTGGGTTTTATCCGCAACAAAGCGAATGGCTATACCA
 CGGAATACTCAGCCTCGGTCAAAGGTCGTTTCACCATTTTCGCGCGATAACAGCAAATCTATCCTG
 TATCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGCGCGCGTGGCGCAT
 ACTGGGGTCAGGGTACGATGGTGACGGTTAGCTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTA
 GTGGCGGTGGCGGTTCCGGCGGTGGCGGTTTCAGATATTGTGATGACCCAGTCTCCGCTGAGTC
 TGCCGGTTACGCCGGGTGAACCGGCAAGTATTTCTGTCTAGTTCCCAGTCCATCGTTTCATTCA
 AACGGTAATACCTATCTGGAATGGTACCTGCAAAAACCGGGCCAGAGCCCGCAACTGCTGATTTA
 TCGTGTTCGAACCGCTTTAGCGGCGTCCCGGATCGTTTCTCAGGCTCGGGTAGCGGCACCGAC
 TTTACGCTGAAAATCTCTCGCGTGGAAGCTGAAGACGTCGGTGTGTATTACTGCTTTTCAGGGCAG
 TTTCTGTCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTGGAAATCAAAGGCGGTAGCCTCGAGCAC
 CATCACCACCATCACTAAGCGGCCGC

Sequência do gene sintético que codifica a cadeia pesada do Fab 14-8:

GAATTCGAAGTTCAATTAGTAGAATCTGGTGGTGGTTTGGTACAACCTAAGGGTAGTTTAAAAATC
 TCCTGTGCTGCCTCTGGTTTCACCTTCAATATCTATGCTATGAACTGGGTTAGACAAGCACCTGGT
 AAAGGTTTGAATGGGTAGCAAGAATAAGATCACAATCCAACAACCTACACTACATACTACGCCGA
 TTCAGTTAAGGACAGATTCACTATTTCAAGAGATGACAGTCAATCTATGTTGTACTTACAAATGAAC
 AACTTAAAGACTGAAGATACAGCTATGTATTACTGTGTTAGACAAATGGGTGACTATTGGGGTCAA
 GGTACCACTTTGACAGTCTCTTCAGCAGTTAAGACCCACCTTCTGTTTACCCATTAGCCCCTGGT
 GGTGGTGCTATTTCTAATTCTATGGTTACATTGGGTTGCTTAGTAAACGGTTATTTTCCAGAACCT
 GTTACAGTAACCTGGAATGCCGGTAGTTTGGGTTCTGGTGTCCATACCTTCCCTGCTGTTTTACAA
 TCAGATTTGTACACATTATCCAGTTCTGTCACCGTTCCAGTAAGTACTTGGCCTTCTGAAGCAGTA
 ACTTGTAACGTCGCCATCCAGCTTCAGCAACATCCGTAGATAAAGCTATATCACCTGTCCGGTGG
 TGGTTCCCATCACCATCACCATCACTAAGCGGCCGC

Sequência do gene sintético que codifica a cadeia leve do Fab 14-8:

GAATTCCTATATCCAAATGACTCAATCCCCAGCATCCTTATCCGTCTCCGTAGGTGAAACAGTAACT
 ATCACTTGTAGAGCATCCGAAAACATCTATTCCTTTTTGGCATGGTACCAACAAAAACAGGGTAAA
 TCTCCACAATTGTTAGTCTATGCTGCAACTAATTTGGCCGATGGTGTTCATCAAGATTTTCTGGT
 TCAGGTTCCGGTACTCAATTCTCATTGAAGATTAATTCATTACAATCCGAAGACTTCGGTACATATT
 ACTGTCAACATTTCTGGGGTACACCTTTTACTTTCCGGTCCGGTACAAAATTGGAATCAAGAGAA
 GTGATGCCGCTCCTACCGTTTCTATTTTCCACCTTCAGCAGCCCAATTGTCTTCAGGTGGTGGT
 TCTGTTGTATGCTTTTTAAACAATTCTACCCAAAGGATATAAATGTAAATGGAAGATAGACGGT
 GCCGAACGTGGTAATGGTGTCTTGAACAGTTGGACCTCTCAAGATTCAGCTGACTCCACTTACAG
 TATGTCCAGTACTTTAACATCTGGTGGTGACGAATACGAAAGACATAACTCATACACTTGTGAAGC
 TACACACAAAACAGTACTTCTCCTATTGTAAAGTCTTTTAACAGAGCTGCATAAGCGGCCGC

Sequência do gene sintético que codifica a cadeia pesada do Fab 14-10:

GAATTCGAAGTCCAATTAGTAGAAAGTGGTGGTGGTTTAGTCCAACCTGGTGGTAGTTTGAGATT
 ATCCTGTGCTGCAAGTGGTTTTACATTTACTGATTATTACATGATCTGGGTTAGACAAGCTCCTGG
 TAAAGGTTTGAATGGTTGGGTTTTATTAGAAATAAGGCTAACGGTTACACTACAGAATACAGTGC
 ATCTGTTAAGGGTAGATTCACTATTAGTAGAGATAACGCAAAGTCTATCTTGTATTTGCAAATGAA
 CTCATTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTTTATTACTGTGCCAGAGGTGCTTACTGGGGTCAAGGTA
 CTATGGTCAAGTTTCTTCAGCATCAACTAAAGGTCCTTCCGTTTTTCCATTAGCCCCTTCCAGTA
 AGTCAACCTCCGGTGGTACTGCTGCATTGGGTTGCTTAGTAAAAGACTATTTTCCAGAACCTGTAA
 CAGTCAGTTGGAACCTCTGGTGCCTTGACATCTGGTGTCCATACCTTCCAGCTGTTTTACAATCTT
 CAGGTTTGTACTCTTTATCCAGTGTTGTAACCGTACCTTCTTCATCCTTGGGTACCCAACTTATAT
 TTGTAACGTCAACCATAAGCCATCTAACACAAAGGTTGATAAAAAGGTAGAACCTAAATCATGCGA
 CAAGACACACACCGGTGGTGGTTCCCATCACCATCACCATCACTAAGCGGCCGC

Sequência do gene sintético que codifica a cadeia leve do Fab 14-10:

GAATTCGACATCGTTATGACTCAATCTCCATTATCCTTGCCTGTTACCCCTGGTGAACCTGCTAGT
ATCTCCTGTAGAAGTTCCCAATCAATCGTTCATAGTAACGGTAACACTTATTTGGAATGGTACTTA
CAAAAACCAGGTCAATCTCCTCAATTGTTGATCTATAGAGTATCAAACAGATTTTCCGGTGTCCCA
GATAGATTCTCTGGTTCAGGTTCCGGTACCGACTTTACTTTGAAGATTTCAAGAGTTGAAGCTGAA
GATGTCGGTGTTTATTACTGTTTTCAAGGTTCTTCGTTCTTGGACATTCGGTCAAGGTACCAAA
GTAGAAATTAAGAGAACAGTTGCTGCACCTTCAGTTTTTATTTTCCCACCTTCCGATGAACAATTAA
AAAGTGGTACCGCATCTGTTGTATGCTTGTTGAACAACCTTCTACCCAAGAGAAGCCAAGGTACAA
TGGAAGGTTGATAATGCTTTGCAAAGTGGTAACTCTCAAGAATCAGTTACTGAACAAGATTCCAAA
GACAGTACATACTCTTTATCTTCAACTTTGACATTGTCTAAGGCAGATTACGAAAAGCATAAGGTC
TACGCCTGTGAAGTTACCCACCAAGGTTTGTCCAGTCCTGTTACTAAGTCTTTCAACCGTGGTGA
ATGCTAAGCGGCCGC

ANEXO B – MAPA DOS VETORES DE EXPRESSÃO UTILIZADOS PARA CLONAGEM

FIGURA 48 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pGEX-4T1 USADO PARA A CLONAGEM DA OSTEOPONTINA

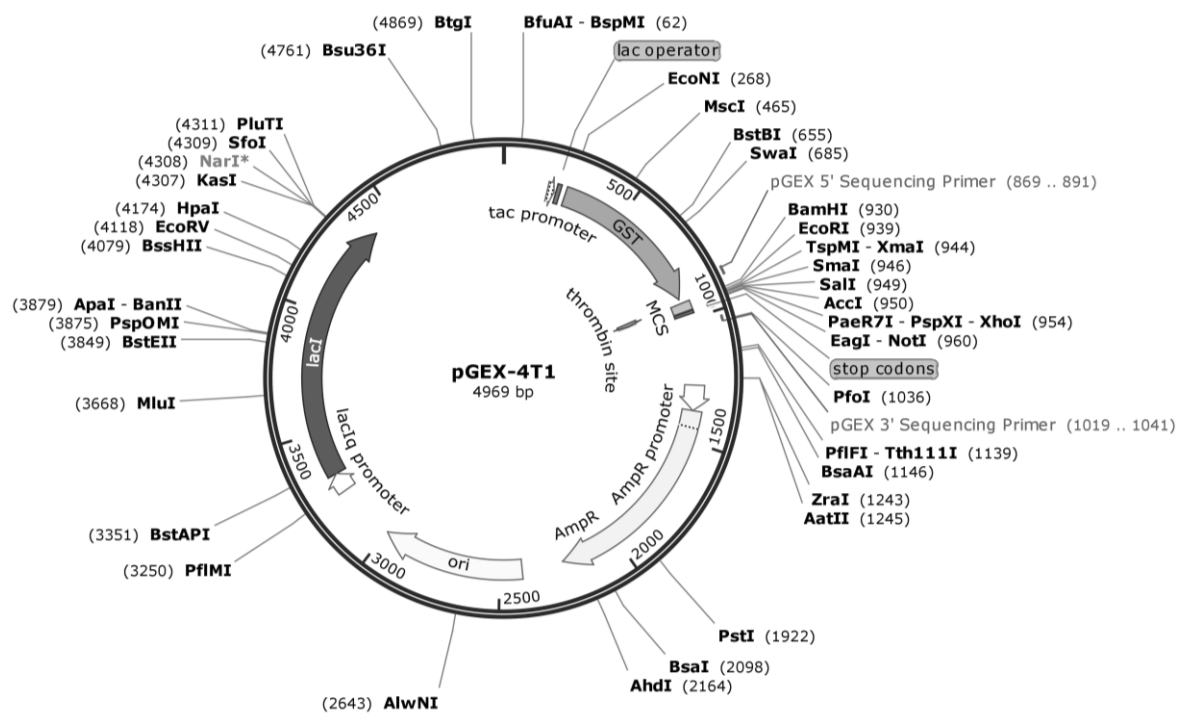


Figura gerada por SnapGene (2018). Vetor pGEX-4T1 contendo promotor *tac*, gene *lacI*, gene de resistência à ampicilina para *E. coli*, sítio múltiplo de clonagem, sítio de reconhecimento de trombina, e gene que codifica GST. FONTE: GE Healthcare.

FIGURA 49 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET28a

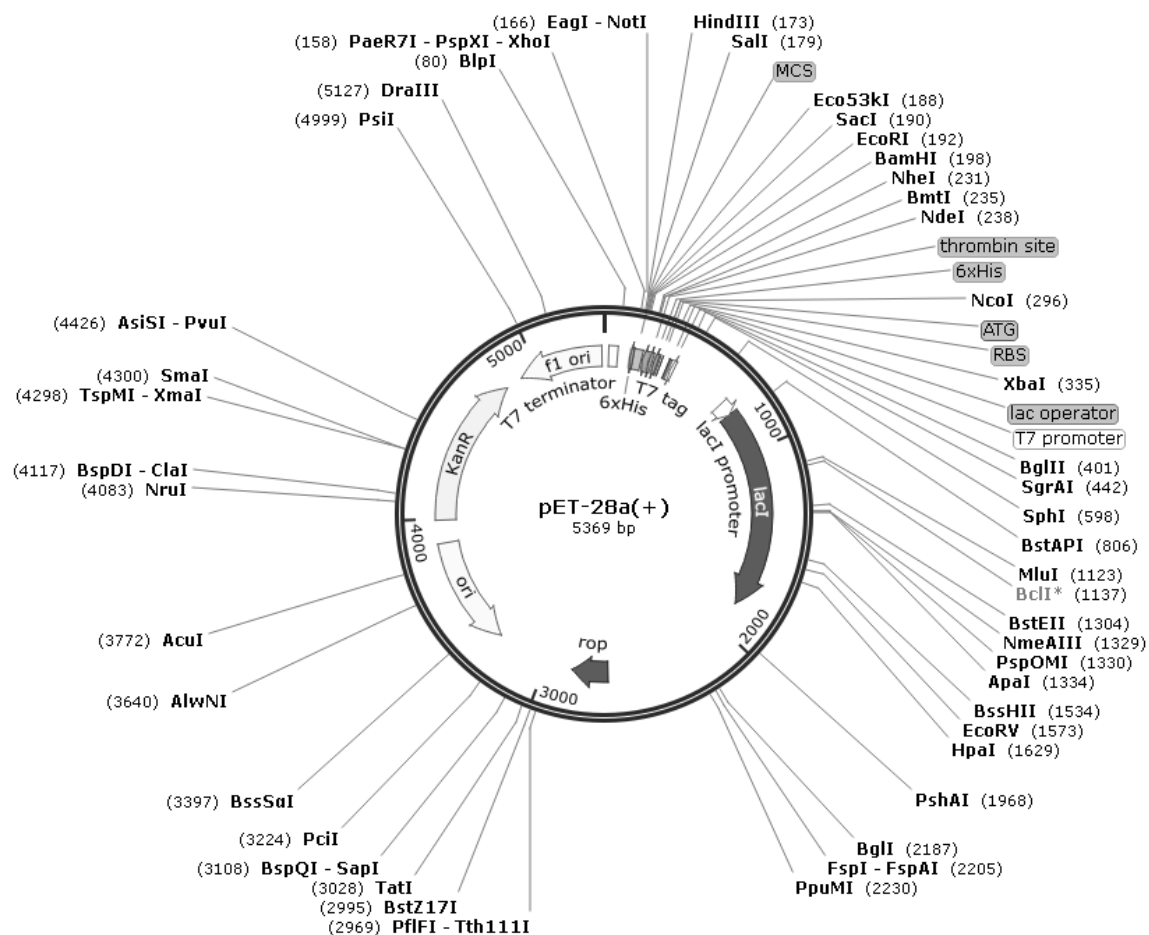


Figura gerada por SnapGene (2017). Vetor pET28a contendo promotor T7, gene lacI, sítio múltiplo de clonagem, hexa-histidina na região N-terminal e na região C-terminal, sítio de reconhecimento de trombina, gene de resistência à canamicina para *E. coli* e sítio de ligação ao ribossomo (RBS).

FONTE: Novagen.

FIGURA 50 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET22b USADO PARA A SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO scFv

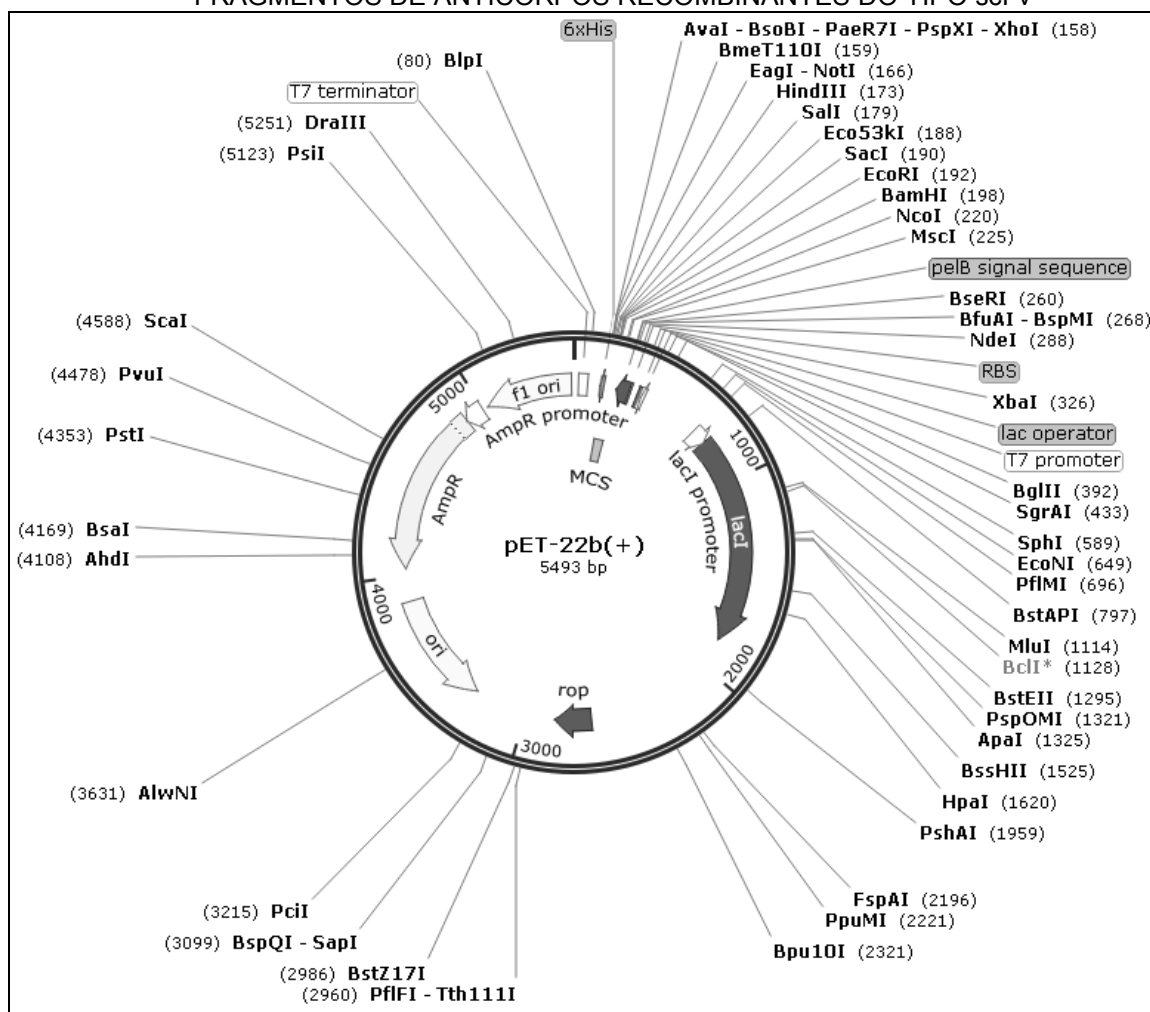
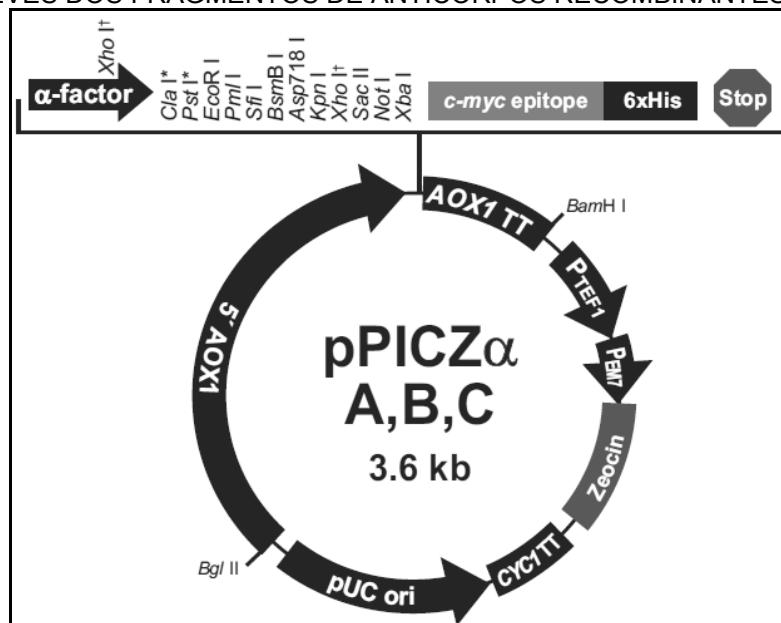


Figura gerada por SnapGene (2017). Vetor pET22b contendo promotor T7, gene lacI, sítio múltiplo de clonagem, peptídeo sinal *pelB* na região N-terminal para endereçamento para o periplasma, hexa-histidina na região C-terminal, gene de resistência à ampicilina para *E. coli* e sítio de ligação ao ribossomo (RBS). FONTE: Novagen.

FIGURA 53 - MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pPICZ α A USADO PARA A SUBCLONAGEM DAS CADEIAS LEVES DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES DO TIPO Fab



FONTE: Invitrogen (2010). Vetor pPICZ α A contendo promotor AOX1, sequência sinal para endereçamento do gene do fator- α originado de *Saccharomyces cerevisiae*, sítio múltiplo de clonagem, hexa-histidina na região C-terminal e gene de resistência a zeocina para *E. coli* e *Pichia pastoris*.